



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREATİK KANSER VE LENFOMA
HASTA SERUMLARINDA ANTİKOR
MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE
BİYOMARKIR TARAMASI**

Adem YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2013



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREATİK KANSER VE LENFOMA
HASTA SERUMLARINDA ANTİKOR
MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE
BİYOMARKIR TARAMASI**

Adem YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2013

ONAY SAYFASI

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Adem YILDIRIM'ın hazırladığı “PANKREATİK KANSER VE LENFOMA HASTA SERUMLARINDA ANTİKOR MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE BİYOMARKIR TARAMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ersan KALAY

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Prof. Dr. Ersan KALAY

Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN

Tarih: .../.../2013

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03/06/2013

Adem YILDIRIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden sürekli istifade ettiğim, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı saydığım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim. Tezimin laboratuvar çalışmalarını yaptığım Alman Kanser Araştırma Merkezi'ne (DKFZ) bağlı Fonksiyonel Genom Analiz Bölüm Başkanı sayın Dr. Jörg HOHEİSEL'e bana bu şansı verdiği için ve çalışmamın danışmanlığını yapan Dr. Christoph SCHRÖDER'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e, sayın Prof. Dr. Fahri Uçar'a, sayın Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca tez yazım aşamasında destek gördüğüm, büyük bir sabırla yardımlarını esirgemeyen sayın Öğretim Görevlisi Dr. Bayram Toraman'a ve sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim hayatımı paylaştığım Anabilim dalımız lisansüstü öğrencilerinden Arş. Gör. Burcu YÜCEL'e, Arş. Gör. Orhan Sezgin'e, Arş. Gör. Ceren SÜMER'e, Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK'e, Sibel MOLLAMEHMETOĞLU'na, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU'na, Figen SEYMEN'e diğer bölüm arkadaşlarıma ve Biyolog Tülay KÖSEAHMET'e ve Kimyager Fatmagül YENİSEY'e teşekkür ederim.

Almanya'daki laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve o günleri bana tebessümle hatırlatacak olan diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamı LLP Erasmus Programı kapsamında destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Dış İlişkiler Ofisi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

Son olarak, öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Adem YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç kapak sayfası	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜRLER	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Kanser	6
4.1.1. Kanserin Gelişimi (Karsinogenez) ve Sınıflandırılması	6
4.1.1.1. Proto-onkogen ve Onkogen	7
4.1.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler	7
4.1.1.3. Kanserlerin Sınıflandırılması	8
4.2. Pankreas, Pankreatitis ve Pankreas Kanseri	9
4.2.1. Pankreas	9
4.2.2. Pankreatitis	10
4.2.2.1. Akut Pankreatitis	10
4.2.2.2. Kronik Pankreatitis	11
4.2.3. Pankreatik Kanser	11
4.2.3.1. Pankreatik Kanserin Tanı ve Tedavisi	13
4.3. Lenf Sistemi ve Lenfoma	13
4.3.1. Lenf Sistemi	13
4.3.2. Lenfoma	14
4.3.2.1. Hodgkin Lenfoma (HL)	15
4.3.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma (NHL)	15
4.3.2.3. Lenfoma Tanı ve Tedavisi	17

4.4. Alternatif Splising	18
4.5. Antikorlar (İmmünoglobulinler)(Ig)	19
4.5.1. Tek Zincir Fragment Variable (ScFv) Antikorları	21
4.6. Western Blot Yöntemi	21
4.7. Mikroarray	22
4.7.1. Antikor Mikroarray Yöntemi	22
5. GEREÇ VE YÖNTEM	24
5.1. Gereç	24
5.1.1. Çalışma Grupları ve Serum Örnekleri	24
5.1.2. Splise Varyant Antikorlarının Test Edilmesinde Kullanılan Örnekler	25
5.1.3. Kimyasallar	26
5.1.4. Kitler	27
5.1.5. Cihazlar	27
5.1.6. Sarf Malzemeleri	28
5.1.7. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Proteinler	28
5.1.8. Antikorlar	28
5.1.8.1. Splise Varyant Antikorları	28
5.1.9. Solüsyonlar	33
5.2. Yöntem	38
5.2.1. Örneklerin Hazırlanması	38
5.2.2. Hücre Hatlarından Protein İzolasyonu	38
5.2.3. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	38
5.2.3.2. Ölçümün Yapılması	39
5.2.4. Protein Örneklerinin Konsantrasyonlarının Ayarlanması	39
5.2.5. Örneklerin Western Blotlama İçin Denatürasyonu	40
5.2.6. Serum Havuzlarının Oluşturulması	40
5.2.7. Örneklerin ve Havuzların Floresan Boyalarla İşaretlenmesi	40
5.2.8. SDS-PAGE Hazırlığı	41
5.2.8.1. SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması	41
5.2.8.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması	42
5.2.9. SDS-PAGE Jellerinin Elektroforezi	44
5.2.9.1. Hazırlanan Jelin Tanklara Yerleştirilmesi	44

5.2.9.2. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	44
5.2.10. Western Blot (Semi Dry Sistem)	44
5.2.11. Western Blot'ın Kontrolü	46
5.2.12. Membran Üzerindeki Proteinlerin Görüntülenmesi	46
5.2.12.1. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi	46
5.2.13. Antikor Mikroarray Çiplerinin Üretilmesi (Antikor Printing)	47
5.2.14. İki Renkli Antikor Mikroarray (Yarışmacı İkili Sistem) Tasarımları	49
5.2.14.1. Doğrudan Karşılaştırma	49
5.2.14.2. Referans Tabanlı Karşılaştırma	50
5.2.15. Hibridizasyon	51
5.2.16. Çiplerin Fotoğraflanması	52
5.2.17. Spotların Tanımlanması	52
5.2.18. Sonuçların Analizi	53
6. BULGULAR	54
6.1. Antikorların Western Blot Yöntemi ile Test Edilmesi	54
6.2. Kalite Kontrol Amaçlı Antikor Mikroarray Çiplerinin Üretilmesi	59
6.3. Üretilen Çiplerin Kalite Kontrolü	60
6.4. Ekspresyon taraması	63
6.4.1. Pankreas Grubu ile Yapılan Ön Tarama	63
6.4.2. Lenfoma Grubu ile Yapılan Ön Tarama	64
6.5. Markır taraması	68
6.5.1. Pankreas Grubu ile Yapılan Markır Taraması	69
6.5.2. Lenfoma Grubu ile Yapılan Markır Taraması	72
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
9. KAYNAKLAR	85
10. ETİK KURUL ONAYI	98
11. ÖZGEÇMİŞ	99

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Nadir görülen ekzokrin pankreatik kanser tümörleri	12
Tablo 2. Nadir görülen endokrin pankreatik kanser tümörleri	12
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan kitlerin listesi	27
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	27
Tablo 6. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerinin listesi	28
Tablo 7. Çalışmada değerlendirilen proteinler	29
Tablo 8. Kanserle ilişkili oldukları bilinen ScFv antikorları	31
Tablo 9. Ticari olarak satın alınan antikorlar.	32
Tablo 10. İkincil (Sekonder) antikorlar	32
Tablo 11. BSA standartlarının oluşturulması	39
Tablo 12. Alt tür havuzları	40
Tablo 13. Kanser (Referans) havuzları	40
Tablo 14. Ayırma jeli içeriği	43
Tablo 15. Yükleme jeli içeriği	43
Tablo 16. Splise varyant antikorlarının validasyonu	56
Tablo 17. Pankreas kanseri örneklerinde ekspresyon değişimleri	64
Tablo 18. Kronik pankreatitis hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri	64
Tablo 19. DLBCL hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri	65
Tablo 20. FL hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri	66
Tablo 21. CLL hasta örneklerinde ekspresyonu değişen proteinler	68
Tablo 22. PK'da MAPK8 ve MAPK9 proteinlerinin ekspresyonları	70
Tablo 23. KP'de CP1A1v, PLD1v ve XBP1 proteinlerinin ekspresyonları	72
Tablo 24. DLBCL'de FGFR3 proteininin ekspresyonu	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Pankreasın Yapısı	10
Şekil 2.	Lenf sistemi ve organları	14
Şekil 3.	Non-Hodgkin lenfomanın alt türlerinin insidansı	16
Şekil 4.	Alternatif splising sonucu farklı transkriptlerin oluşması	19
Şekil 5.	Antikorların yapısı ve bölgeleri	20
Şekil 6.	ScFv antikotlarının yapısı	21
Şekil 7.	Sandviç oluşumu	46
Şekil 8.	Antikorların çiplere spotlanması	48
Şekil 9.	Pankreas grubu ön tarama tasarımı	50
Şekil 10.	Lenfoma grubu ön tarama tasarımı	50
Şekil 11.	Pankreatik kanser için markır taraması tasarımı	51
Şekil 12.	Lenfoma için markır taraması tasarımı	51
Şekil 13.	Kontrol grubu SNR grafikleri	62
Şekil 14.	Pankreas kanseri hastalarında bulunan markır proteinler	69
Şekil 15.	Kronik pankreatitis hastalarında bulunan markır proteinler	71
Şekil 16.	DLBCL’de FGFR3 proteinin ekspresyon seviyesi	72

RESİMLER DİZİNİ

Resim		Sayfa
Resim 1.	Spotların çip üzerinde tanımlanması	49
Resim 2.	Spotların tanımlanması	53
Resim 3.	Western blot sonuçları ile antikorların sınıflandırılması	55
Resim 4.	Normal ve kanser örneklerinin bant paternlerinin karşılaştırılması	59
Resim 5.	Kalite kontrol çiplerinin fotoğraflanması	61

KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

AS	Alternatif splising
Ab	Antikor
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovin serum albumin
DLBCL	Difüz büyük B-hücre lenfoması
ECM	Hücre dışı matriks
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FL	Foliküler lenfoma
HRS	Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücreleri
KP	Kronik pankreatitis
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
NHL	Non-Hodgkin lenfoma
NK	Natural killer hücreleri
nm	Nanometre
NR	Sağlıklı örnek
PDAK	Pankreatik adenoduktal karsinoma
PK	Pankreatik kanser
RT-PCR	Revers transkriptaz polimer zincir reaksiyonu
ScFv	Single chain fragment variable
SLL/CLL	Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. ÖZET

Pankreatik Kanser ve Lenfoma Hasta Serumlarında Antikor Mikroarray Yöntemi ile Biyomarkır Taraması

Kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra insan ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır ve kontrolsüz hücre bölünmesiyle gelişen heterojen bir hastalıktır. Beş yıllık sağkalım oranı %5'in altında olan Pankreatik kanser (PK) en ölümcül kanser türlerinden biridir. Erken teşhis araçları, tedavi seçeneklerini ve sonuçlarını önemli ölçüde geliştirebilecektir. Ayrıca B hücre lenfomalarının farklı türlerinin tanısının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu malignant tümörler lenfositlerde meydana gelen ve yüksek derecede heterojen olan kanser tipidir.

Çalışmamızda, potansiyel diagnostik biyomarkırların ve terapötik hedeflerin tanımlanması hedeflenerek, kan örneklerinin profillenmesi için, antikor mikroarray teknolojisi kullanıldı. Bu sebeple, çeşitli kanser türlerinde eksprese olduğu bilinen 46 farklı gene ait 100 splise varyantı kullanılarak bir antikor mikroarray çipi geliştirildi. Bu çipe karsinogenez ilişkili mekanizmalarda rol oynayan 31 proteine spesifik antikor ilave edildi.

Tüm antikorlar, özgünlüklerinin değerlendirilmesi amacıyla western blotlama yöntemi ile hücre hattı ve doku örneklerinde dikkatlice valide edildi. Bu validasyonda tümör ve normal örneklerde, farklı bağlanma paternine sahip olanlar, dolayısıyla tanısal potansiyeli olanlar belirlendi. Ayrıca lenfoma ve pankreatik kanser hastalarından elde edilen serum örnekleri antikor mikroarrayde sağlıklı kontrollerle karşılaştırılarak analiz edildi.

Pankreatik kanserde, MAPK8 ve MAPK9 protein izoformlarının ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenirken, kronik pankreatitiste CYP1A1v, PLD1-114, XBP-1S izoformları da değişmiş seviyede görüldü. Difüz büyük B-hücre lenfomasında da FGFR3 potansiyel biyomarkır olarak belirlendi.

Böylece, antikor mikroarrayin etkili ve güçlü kullanımıyla serum örneklerinin profillenmesi gerçekleştirildi. Ek olarak, bazı splise varyantları kanserin tanısının gelişmesi için potansiyel biyomarkır olarak belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Antikor Mikroarray, Splising, Biyomarkır, Erken tanı, Plazma

2. SUMMARY

Biomarker screening with antibody microarray in the plasma of pancreatic cancer and lymphoma patients

Cancer has the second position in the human deaths after cardiovascular diseases. It is a heterogeneous disease group, which develops by uncontrolled cell division. With a 5-year survival rate of less than 5% pancreatic cancer (PC) is one of the most lethal types of all cancers. Means for an early diagnosis would improve the treatment options and outcome dramatically. There is also a need to improve differential diagnosis in B-cell lymphoma. These malignant tumors occur in lymphocytes and are an highly heterogeneous cancer type.

In our study, we did use antibody microarray technology for a profiling of blood samples with the aim to identify potential diagnostic biomarkers as well as therapeutic targets. Therefore, an antibody microarray was build, which targets 100 splice variants of 46 distinct genes known to be expressed in various cancer types. This set was supplemented by antibodies against 31 proteins which play a role in carcinogenesis associated mechanisms.

All antibodies were carefully validated by western blotting on cell line as well as tissue samples in order to judge their specificity. In this validation antibodies were identified which had a differential binding pattern in tumor and normal samples and thereby might have a diagnostic potential. In addition, plasma samples from lymphoma patients as well as from patients suffering from pancreatic cancer were analysed on antibody microarrays and compared with healthy controls.

For pancreatic cancer, a significantly differentiation was observed in the expression of protein isoforms for MAPK8 and MAPK9, while isoforms of CYP1A1v, PLD1-114, XBP-1S occurred at altered levels in chronic pancreatitis. In diffuse large B-cell lymphoma patients FGFR3 was identified as a potential marker.

Thereby, the effective and robust use of antibody microarrays for a profiling of plasma samples was demonstrated. In addition, certain splice variants were identified as potential biomarker candidates to improve the diagnosis in cancer.

Key Words: Antibody Microarray, Splicing, Biomarker, Early diagnosis, Plasma

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, DNA hasarı sonucu hücrelerin, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarından kurtularak kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Normal programından sapan bu hücrelere kanser hücresi, bu olaya ise karsinogenez denilmektedir. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra insan ölümüne en fazla neden olan hastalıktır (1, 2).

En tehlikeli kanser türlerinden biri olan pankreatik kanser (PK), Avrupa’da ölüm oranı olarak altıncı Amerika’da ise dördüncü sıradadır. PK’li hastaların yaklaşık %95’i beş yıldan daha kısa bir yaşam süresine sahiptir ve her yıl 200 000’den fazla insan PK’den ölmektedir (3, 4).

Cerrahi müdahale ile birlikte uygulanan kemoterapi günümüzdeki başvuru tedavi yöntemidir. Fakat tedavinin etkili sonuç vermesi için gereken erken tanı, sadece hastaların %20’sinde mümkün olabilmektedir (5-8). Pankreatik kanserin erken dönemde saptanamamasının nedenlerinin başında anatomik lokalizasyonu, kendini geç göstermesi, agresif invazyon ve metastazın erken şekillenmesi gelmektedir (9). Ayrıca hastalığın diğer semptomları olan sarılık, bulantı ve karın ağrısı da erken safhada gözlemlenmemektedir (10). Bilinen yaklaşımlarla, erken tanının önünde engel olarak görülen bu olumsuz faktörler, PK’nın erken tanısına ve buna bağlı olarak etkin tedavisine katkı sağlayacak yeni biyomarkırların ve terapötik hedeflerin önemini ön plana çıkartmaktadır (11).

Lenfoma, immün sistemin bileşenlerinden olan B ve T lenfositlerinin ve natural killer (NK) hücrelerin kanserleşmesidir. Lenfoma tanısı konulan hastaların beş yıllık yaşam süresi yaklaşık %70 olup, 2012 yılında Amerika’da 80 000 civarında lenfoma hastasının %25’inin lenfoma nedeniyle hayatlarını kaybedebileceği ön görülmektedir (12).

Lenfoma yüksek derecede heterojenite göstermektedir. Genel olarak Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin’s lenfoma olarak iki alt gruba ayrılan lenfoma, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) sınıflandırmasına göre 30’dan fazla alt türe ayrılmaktadır ve bu alt grupların ayrımının yapılması zordur. Bununla birlikte tedavi protokollerinin

belirlenmesinde alt grup ayrımının yapılması büyük bir öneme sahiptir ve günümüzde alt grupların sınıflandırılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır (13, 14).

Lenfoma tedavisinde genellikle kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak kemik iliği nakli çalışmaları da yapılmaktadır. Fakat tüm hastalar için pozitif sonuçlar elde edilememektedir (15, 16). Ayrıca genç hastalara uygulanan kemoterapi sonrası birçok yan etki ortaya çıkmakta ve ilerleyen yaşlarda farklı malignansiler gelişebilmektedir. Bu bakımdan, hastalığın daha etkin tedavisi ve tedavinin yan etkilerinin azaltılması için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (17). Bulunabilecek yeni markırlar hastalığın tanı ve tedavisinin yanında, alt türlerin sınıflandırılmasında da önemli bir yere sahip olacaktır (18).

Günümüzde bazı proteinlerin ve bu proteinlerin splise varyantlarının farklı ekspresyon seviyeleri çeşitli kanser türlerinde biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Bu markırların bazıları kan plazmasında bulunmaktadır ve erken tanı açısından çok daha önemlidir (19). Pankreas kanserinde CXC chemokine ligand 7 (CXCL7) proteininin plazmadaki seviyesinin düştüğü gösterilmiştir ve bu sebeple CXCL7 proteini potansiyel bir biyomarkır olarak görülmektedir (20).

Çok sayıda proteinin varlığının ve ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde etkin ve kolay bir yöntem olan antikor mikroarray teknolojisi son zamanlarda kanserin erken tanısında kullanılabilecek biyomarkırların araştırılmasında önemli bir yer edinmiştir (21).

Antikor mikroarray teknolojisi; serum veya hücre lizatlarında proteinlerin ekspresyon seviyelerini belirlemeyi hedefleyen bir yaklaşımdır. Çok düşük miktarlarda örnek kullanarak yüzlerce farklı proteinin ekspresyon analizinin yapılmasına olanak sağlayan antikor mikroarray teknolojisi son yıllarda proteomik çalışmalar için önemli bir araç haline gelmiştir (22).

Alternatif splising ile onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin ve apoptotik genlerin çeşitli varyantları oluşmaktadır (23). Bu varyantların, karsinogeneizde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (23). Günümüzde, bu varyantların; tanının konulması, prognoz takibi ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi gibi süreçlerde potansiyel biyomarkır olabileceği düşünülmektedir (24, 25).

Bu çalışmada; antikör mikroyarray yöntemi ile farklı kanser türlerinde, karsinogenik mekanizmalarında rolü olduğu bilinen 46 farklı gene ait splising varyantları ve karsinogenez ile ilişkili 31 farklı protein arasından gerek PK ve gerekse lenfoma için biyomarkır ya da terapötik hedef olabilecek proteinlerin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

İnsan vücudundaki milyonlarca hücre, kendi kaderini belirleyecek olan genetik bilgiyi bünyesinde taşır ve bu bilgiyi kullanarak yaşamsal faaliyetlerini (bölünme, çoğalma, farklılaşma vb.) gerçekleştirir. Hücrenin bu faaliyetleri karmaşık mekanizmalarla kontrol edilir. Meydana gelen birçok hastalık genetik bilginin bozulması (mutasyon) sonucu ortaya çıkar ve bu bozulmalar hücrenin yaşamsal faaliyetlerini etkiler (26). Kanser; genetik materyalinde yıkıcı bir mutasyon meydana gelen tek bir hücrenin bölünmesiyle oluşur. Bu mutasyonlar sayesinde hücre, normal hücre döngüsü kurallarına uymayan, kontrolsüz olarak bölünen ve farklı dokuları istila eden bir yapıya bürünür. Normal programından sapan bu hücrelere kanser hücresi, olaya da karsinogenez denilir (1, 2).

İnsan vücudu kendini mutasyonlardan korumak için çeşitli tamir mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar; DNA hasarını algılayarak tamir etmeye çalışmaktadır. Algılanan hasarların tamir edilemediği durumlarda ise hücre programlı hücre ölümüne (apoptozis) yönlendirilmektedir. Birçok kanser çeşidi ise hücrenin tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu meydana gelen mutasyonların birikimiyle oluşmaktadır (2, 27).

Günümüzde kanser, en yaygın ve öldürücü hastalıkların başında gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada olan kanser, insanların yaklaşık %30'undan fazlasında görülmektedir. Ölümlerin yaklaşık dörtte birinden sorumlu olan kanser için gelişmiş ülkelerde yapılan sağlık harcamaları toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %10'nunu oluşturmaktadır. Erken tanı ve tedaviye yönelik çalışmalar kanser araştırmalarının başında gelmektedir. Genetik olarak kansere yatkın bireylerde kanserin, başlangıç evrelerinde saptanması etkin bir tanı ve tedavi için çok büyük önem arz etmektedir (2, 28).

4.1.1. Kanserin Gelişimi (Karsinogenez) ve Sınıflandırılması

Kanser gelişiminde hücre bölünmesi, çoğalması ve hücre ölümü gibi mekanizmalar temel yapıtaşları olarak görev yapmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar bu mekanizmalarla ilgili genlerde meydana gelen mutasyonların kanser

gelişiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Mutasyonlar spontan bir şekilde her hücre döngüsünde tahmini olarak 10^{-6} oranında meydana gelebilmekte. Bunun yanında çeşitli kanserojen ajanların (kimyasal ajanlar, toksinler, serbest radikaller, UV ışını, iyonizan radyasyon ve virüsler vb.) ve çevresel etkenlerin indüklenmesiyle de mutasyonlar oluşabilmektedir (27).

Mutasyona uğrayarak kanser oluşumunda rol alan bu genler, proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılmaktadır.

4.1.1.1. Proto-onkogen ve Onkogen

Hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması ile ilgili sinyal yollarında rol oynayan ve aşırı ekspresyonunda kanser gelişen normal genlere proto-onkogen denilmektedir. Proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu onkogenler oluşmaktadırlar. Mutasyonlar, onkogenin kendisinde veya aktive edici elementinde meydana gelebilir. Onkogenler dominant etkili olup tek allelin aşırı ekspresyonu kanser gelişimi için yeterli olabilmektedir (2, 29).

Onkogenlerin kodladığı proteinlerin her birinin nasıl çalıştığı tam olarak bilinmemekle birlikte çoğunun büyüme kontrol yolu üzerindeki genlere benzer şekilde çalıştığı bilinmektedir. Memeli hücrelerinde büyüme kontrolüne katılan proteinleri fonksiyonlarına ve yapılarına göre; büyüme faktörü, hormon reseptörleri, hücre içi sinyal iletiler ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere dört farklı gruba ayırabiliriz (27, 30).

4.1.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücrelerde çeşitli kontrol mekanizmalarının yanında, hücre çoğalmasının inhibisyonu ve hücre ölümü arasında bir denge sağlamaktadırlar (29). Onkogenlerin kodladıkları proteinler fonksiyon kazanımı ya da bir allelin artmış veya uygun olmayan ekspresyonu ile gelişirken, tümör baskılayıcı genler, her iki allelin fonksiyonunu yitirmesi gibi mekanizmalarla kanser gelişimine neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genler son derece heterojen bir gruptur. Bazı genler hücre siklusunun düzenlenmesinde ve hücre-hücre temasıyla büyümenin engellenmesinde görev alırlar. Bunlar hücre büyümesini doğrudan düzenledikleri için “gatekeepers” olarak adlandırılırlar (Örn: *Rb*). Diğer genler ise DNA tamir mekanizmasında ve genomik

bütünlüğün sağlanmasında görev alırlar. Bu sebeple “caretakers” olarak adlandırılırlar (Örn: p53) (2). 2004 yılında Franziska Michor ve arkadaşları tarafından bu sınıflandırmaya 3. bir gen grubu eklenmiştir. “Landscape” olarak adlandırılan bu gen grubu, mutasyona uğradığında düzensiz hücre büyümesini tetikleyen bir stromal çevre oluşturmaktadır (Örn: SMAD4) (31, 32).

Genetik yapıdaki bu değişimlerin birikimiyle hücreler sınırsız bölünme, kontak inhibisyon kaybı, büyüme faktörlerine ihtiyaç duymama, hücrel sinyallerden etkilenmeme gibi özellikler kazanmaktadır (26).

4.1.1.3. Kanserlerin Sınıflandırılması

Kanserler köken aldıkları dokuya göre temel olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar;

1. **Karsinomalar:** Bronşlar, bağırsak mukozası veya meme duktusları gibi epitel hücrelerinden kaynaklanırlar ve insan kanserlerinin yaklaşık %90’ını oluştururlar (33, 34). Temel olarak iki alt tipi vardır; organ ve bezlerde gelişen adenokarsinomalar ve yassı epitel hücrelerinden gelişen sküamöz hücre karsinomaları (12).
2. **Sarkomalar:** Kemik, kas ya da bağ doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %1’ini oluştururlar (33, 34). Osteosarkoma, fibrosarkoma ve anjiyosarkoma gibi çeşitli alt türleri bulunmaktadır (12).
3. **Hematopoetik:** Kemik iliği ya da lenfatik sistemde meydana gelen ve damarlar yoluyla yayılan lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %8-9’unu oluştururlar (33, 34). Lenfomalar Hodgkin lenfoma ve non-hodkin lenfoma olmak üzere iki temel alt gruba ayrılır (12, 35).

Bu tümörlerin her biri yerleşim yerine, doku tipine, histolojik yapısına ve ayrıca malignitesine göre de sınıflandırılmaktadırlar (34). Tümörler, agresif büyüme derecesine göre ise iki farklı sınıfa ayrılmaktadır.

Uzak dokuları istila etmeyen, bölgesel olarak büyüme gösteren tümörler iyi huylu (**benign**), uzak dokuları istila eden tümörler ise kötü huylu (**malign**) tümörler olarak

adlandırılır (33, 34). Malignant tümörler dolaşım sistemine karışarak köken aldıkları dokudan çok daha uzaktaki bölgelere ulaşarak, farklı dokularda yeni tümör kolonileri oluşturabilirler. Bu durum metastaz olarak adlandırılır ve ilgili kanserin agresifliğini gösterir. Metastatik kanser, kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ından sorumludur (1, 34).

4.2. Pankreas, Pankreatitis ve Pankreas Kanseri

4.2.1. Pankreas

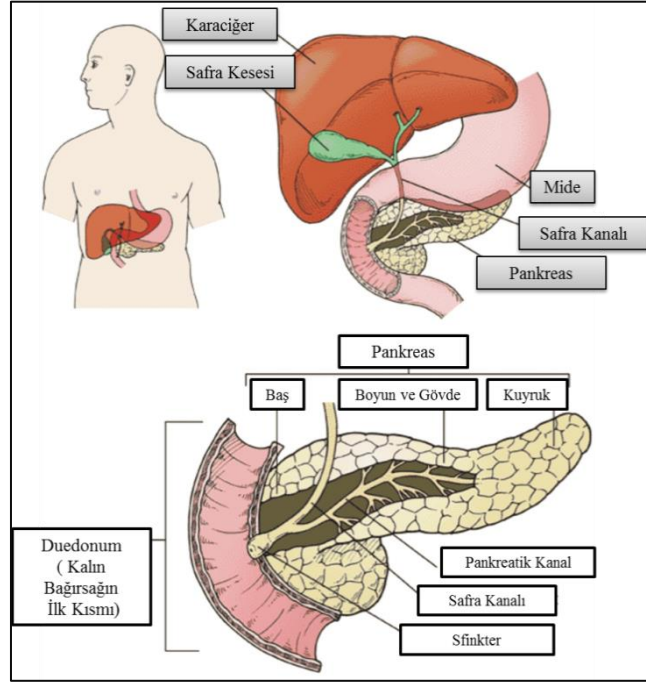
Besinlerin sindirim metabolizmasında görevli olan önemli bir organdır. Besinlerin parçalanmasında görev yapan enzimlerin salınımı (ekzokrin fonksiyon) ve kan şekerini düzenlenmesi (endokrin fonksiyon) olmak üzere iki temel fonksiyonu vardır (36-38).

Anatomik olarak midenin arkasında yer alır. Karaciğer, ince bağırsak ve dalak tarafından çevrilmiştir. Pankreas: baş olarak adlandırılan karnın ortasında yer alan geniş kısım; boyun ve gövde olarak adlandırılan orta kısım; vücudun solunda kadar uzanan, ince kuyruk kısmı olmak üzere üç bölümden oluşur (Şekil 1). Superior mezenterik arter, süperior mezenterik ven, portal ven ve çölyak ekseni gibi büyük kan damarları ile çevrilidir ve bu damarlardan beslenir (9, 39).

Normal pankreas; islet hücreleri, asinüs (acini) ve kanal (duct) hücreleri olmak üzere üç farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Islet hücreleri insülin, glukagon ve somastatin gibi hormonları üretirken, asinüs hücreleri lipaz gibi enzimleri üretmektedir (4, 40).

- 1. Ekzokrin Fonksiyon:** Pankreas sindirim enzimleri salgılayan ekzokrin bezlere sahiptir. Besinin mideye gelmesiyle pankreas suları pankreas kanallarına salgılanır. Safra kanalları karaciğer ve safra kesesinden üretilen bir diğer sindirim sıvısı olan safrayı safra kanallarına bırakır. Her iki kanal sfinkterde birleşerek, safra ve pankreatik enzimleri duodenumdan ince bağırsağa salgılar. Bu enzimler besinlerin (yağ, karbonhidrat ve protein) sindirimine yardımcı olur (36, 38).
- 2. Endokrin Fonksiyon:** Pankreasın endokrin sisteminin bileşenlerini islet hücreleri oluşturur. Bu hücreler insülin, glukagon gibi hormonları direk olarak dolaşım sistemine salgılar. Bu hormonlardan iki tanesi insülin ve glukagondur. Beta (Islet hücrelerinin %65-80'ini oluştururlar.) hücreleri tarafından salgılanan insülin kan şekerini düşük düzeyde tutarken, alfa (Islet hücrelerinin %15-20'sini oluştururlar)

hücreleri tarafından salgılanan glukagon ise şekeri artıran hormon olarak görev yapar. Şeker seviyesi karaciğer, mide ve beynin düzgün çalışmasında önemlidir (36, 41).



Şekil 1. Pankreasın yapısı, (Klikdokter'den, 37)

4.2.2. Pankreatitis

Pankreatitis pankreasta meydana gelen inflamasyon durumudur. İnflamasyon vücuddaki herhangi bir yaralanmaya karşı immün sistemin verdiği bir reaksiyondur. Pankreatitisin iki formu vardır; akut pankreatitis ve kronik pankreatitis (42, 43).

4.2.2.1. Akut Pankreatitis

Akut pankreatitis aniden ortaya çıkıp kısa süreli olarak kendini gösterir (42). İngiltere, Danimarka ve USA'dan elde edilen verilere göre akut pankreatitisin görülme sıklığı 100 000 hastada 4 ile 25 olgu arasında değişmektedir. Avrupa'da yapılan çalışmalarda çeşitli istatistiksel veriler bulunmuştur. Fakat erken kronik pankreatitise benzerliği ya da alkol tüketim oranlarının farklı olması gibi tez avantajlar anlamlı sonuçların elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Akut pankreatitis tedavi edilmediği durumlarda daha ağır formu olan kronik pankreatitise neden olabilmektedir (42, 44).

4.2.2.2. Kronik Pankreatitis

Kronik pankreatitis, uzun süreli olarak devam eden, yavaş yavaş kötüleşen ve sonuçta pankreasta kalıcı sorunlara nedenolan bir hastalıktır. Kronik pankreatitis'in etiyolojisinde uzun süreli alkol tüketimi önemli bir yere sahiptir. Bunun yanında, akut pankreatitis, bazı ilaçların kullanımı, kistik fibröz, ani otoimmün durumlar, hiperkalsemi gibi nedenlerle de gelişebilir (45, 46).

Kronik pankreatitisin tedavi edilememesi durumunda diyabet ve pankreatik kanseri gibi yaşam kalitesini düşüren veya ölümle sonuçlanan hastalıklar görülmektedir. Diyabet, insülin üreten beta hücrelerinde inflamasyon sonrası meydana gelen hasarla oluşmaktadır (45).

Kronik pankreatitisin en ölümcül sonucu ise pankreatik kanserdir. Hastada kronik inflamasyon durumu genellikle gatekeeper ya da caretaker genlerinde değil landscaper genlerinde bozukluğa yol açmaktadır. Örneğin *PRSS1* geninde meydana gelen mutasyon kronik pankreatitis ile ilişkilendirilmiştir (47). Bu gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar anormal stromal çevre oluşturarak noplastik transformasyonu tetiklemektedir. Ayrıca kronik pankreatitis ile ilgili birçok faktör pankreatik hücrelerin malignant transformasyonu için gerekli olan genomik hasarı ve hücresel proliferasyonu artırdığı gözlenmiştir. Tüm bu değişimler pankreası, en ölümcül hastalıklardan biri olan pankreas kanserine sürüklemektedir (31, 48).

4.2.3. Pankreatik Kanser

En tehlikeli kanser türlerinden biri olan pankreatik kanser (PK), Avrupa'da ölüm oranı olarak altıncı, Amerika'da ise dördüncü sıradadır. PK'li hastaların yaklaşık %95'i beş yıldan daha kısa bir yaşam süresine sahiptir ve her yıl 200 000'den fazla insan PK'den ölmektedir (3). PK'in iki alt tipi bulunmaktadır. Birincisi pankreasın ekzokrin kısmından gelişen ekzokrin tümörlerdir ve pankreatik kanserlerin %95'inden fazlasını oluşturmaktadırlar. Diğer tümör tipi ise pankreasın endokrin kısmından gelişen endokrin tümörlerdir (4, 36).

Ekzokrin tümörlerden gelişen pankreatik adenokarsinoma (PDAK) tüm pankreas kanserlerinin %75'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bu nedenle pankreatik kanser denilince çoğu araştırmacı pankreatik adenokarsinomayı ele almaktadır. Mikroskopik

olarak PDAK'ın bir boşluk etrafında hücrelerin toplanmasıyla glandlar (bez benzeri yapı) oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu tip tümörler çok hızlı büyür ve sırtta ağrı yaparlar. Ayrıca sıklıkla karaciğer ve lenf sistemine sıçrarlar (metastaz). Ekzokrin tümörlerin nadiren görülen diğer formları da bulunmaktadır (Tablo 1) (4).

Tablo 1. Nadir görülen ekzokrin pankreatik kanser türleri (Centre'den, 2)

Pankreatik Ekzokrin Kanser Türleri	Özelliği
Asinüs Hücre Karsinoması	Aşırı artmış sindirim enzimleri
Adenosquamous Karsinoma	Glandlar oluşturur, Squamous farklılaşma
Kolloid Karsinoma	Prognozu kolay, yüzen hücreler.
Büyük Hücre Karsinoması	Çok büyük hücelere sahip.
Hepatoid Karsinoma	Karaciğer kanseri hücrelerine benzer.
Intraduktal Papillary-Mucinous Neoplazm	İnvazyon için ön lezyonlar oluşturur.
Mucinous Sistik Neoplazm	Akışkan sistik tümör. Genellikle kuyrukta.
Pankreatoblastoma	Çocuklarda görülür.
Serous Sistadenomas	İyi huylu tümörler.
Signet Ring Hücre Karsinoma	Yüzük formunda hücreler.
Solid ve Pseudopapillary Tumors	Genellikle kadınlarda görülür.
Farklılaşmamış Karsinoma	Aşırı farklılaşmış formu.

Pankreatik kanserlerin diğer türleri endokrin tümörlerden gelişmektedir. Tüm pankreatik kanserlerin %5'inden azını oluşturmaktadırlar. Yılda 5/1 000 000 oranında görülmektedirler. Bu tümörlerin ekzokrin tümörlerden ayrılması tedavi yöntemi açısından çok önemlidir. Temel olarak islet hücre tümörleri ya da farklılaşmış pankreatik nöroendokrin tümörler olarak adlandırılırlar (49). Nadir olarak görülen alt türleride bulunmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Nadir görülen endokrin pankreatik kanser türleri (Centre'den, 2)

Pankreatik Endokrin Kanser Türleri	Özelliği
Gastrinoma (Zollinger-Ellison Syndrome)	Gastrinin aşırı üretimi
Glucagonoma	Glukagonun aşırı üretimi, Metastatik
Insulinoma	İnsülinin aşırı üretimi
Nonfunctional Islet Cell Tumor	Saptaması zor, malignant
Somatostatinoma	Somatostatinin aşırı üretimi

4.2.3.1. Pankreatik Kanserin Tanı ve Tedavisi

Pankreatik adenoduktal karsinoma hastalarında genel olarak *K-ras* onkogeninde mutasyon ve *Tp53*, *BRCA2* gibi tümör süpressör genlerde de inaktivasyon gözlemlenmektedir. Ayrıca büyüme faktörleri hastalığın gelişiminde önemli rol oynamaktadır (50).

Cerrahi müdahale ile birlikte uygulanan kemoterapi günümüzdeki temel tedavi yöntemidir. Tedavinin uygulanması için gerekli olan erken tanı, sadece hastaların %20'sinde mümkündür. Birçok tümör, kesin bir tedavi şansını son derece kısıtlayacak şekilde ileri safhada saptanmaktadır (5-8). Pankreatik kanserin saptanamamasının nedenlerinin başında anatomik lokalizasyonu, kendini geç göstermesi, agresif invazyon, metastazın erken şekillenmesi gelmektedir (9). Ayrıca hastalığın diğer semptomları olan sarılık, bulantı ve karın ağrısı da geç evrede görülmektedir (10). Bilinen yaklaşımlarla, erken tanının önünde engel olarak görülen bu olumsuz faktörler, PK'nın erken tanısına ve buna bağlı olarak etkin tedavisine katkı sağlayacak yeni biyomarkırların ve terapötik hedeflerin önemini ön plana çıkartmaktadır (11). Günümüze kadar pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiş birkaç tümör markırı tanımlanmıştır. Bunlar arasından karbonhidrat antijeni (CA19-9) standart tümör markırı olarak kabul edilmektedir. CA19-9'un duyarlılığı %41-80 arasında değişirken özgünlüğü ise %33 ile 100 arasında görülmektedir. Karsinoembriyonik antijen (CEA) yine gastrointestinal hastalıklarda sıklıkla kullanılan bir diğer markırdır. CEA ilk olarak pankreas kanseri için kullanılmaya başlanmış fakat CA19-9'un keşfi ile popüleritesini kaybetmiştir (51). Bu bilgilere paralel olarak gelişen süreç kanserin erken tanı ve tedavisinde moleküler hedeflerin aydınlatılmasının ve onların kanser üzerindeki etkilerinin anlaşılmasının çok önemli bir yere sahip olduğunu da göstermiştir (52). Pankreatik kanserde moleküler yolların belirlenmesi hastalığın gelişiminin anlaşılması ve takibi açısından diğer önemli bir yaklaşımdır (53).

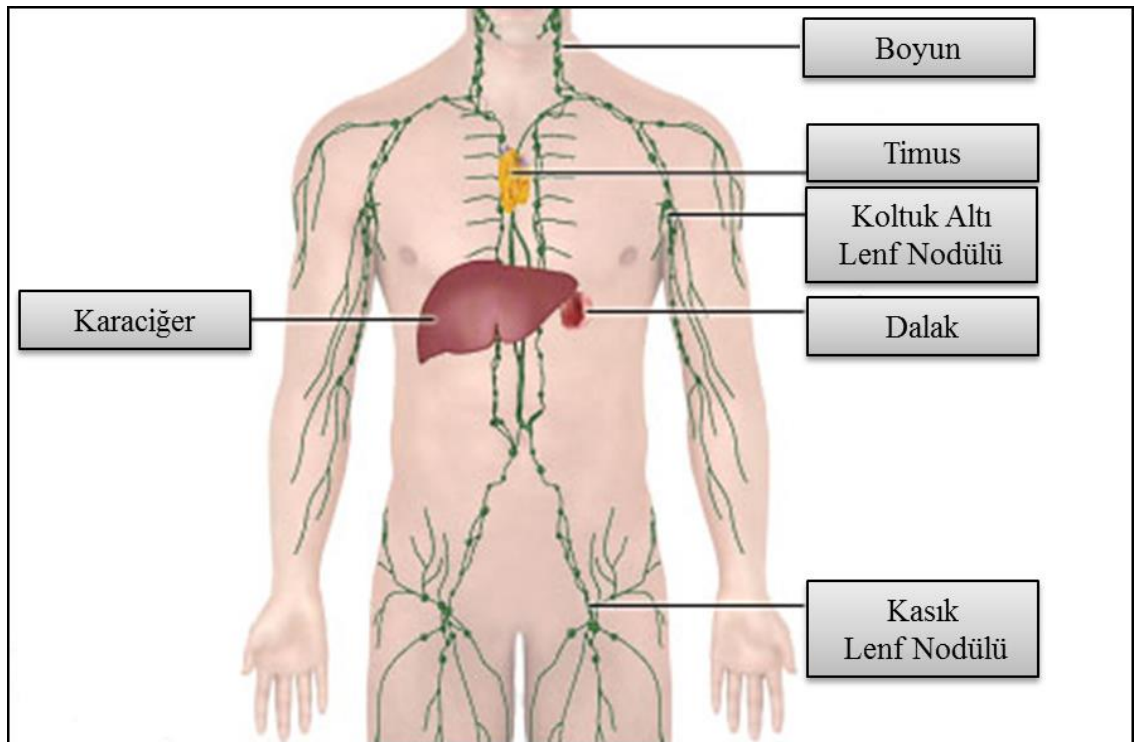
4.3. Lenf Sistemi ve Lenfoma

4.3.1. Lenf Sistemi

Lenf sistemi lenf nodülü, lenf kanalları ve lenf damarlarının oluşturduğu ikinci bir dolaşım sistemidir. Lenf sistemi, lenf sıvısını dokulardan kana taşımakla görevli olan

immün sistemin temel yapısıdır. Lenf sıvısı; beyaz kan hücreleri (B ve T lenfositler), kilüs diye adlandırılan bağırsak sıvısı (Protein ve yağ içerir), natural killer (NK) hücreleri gibi bileşenlerden oluşmaktadır (54).

Lenf nodları küçük, yumuşak, yuvarlak ya da fasulye gibi yapılardır. Genellikle kolayca görünmezler ve vücudun çeşitli bölgelerinde yer alırlar (boyun, koltuk altı, kasık, göğüs ve karın). Lenf nodülleri enfeksiyonlara karşı immün sistem hücrelerini oluştururlar. Ayrıca lenf sıvısını bakteri ve kanser hücreleri gibi yabancı materyalden temizlerler. Lenf sıvısında yabancı ajan saptandığında, lenf nodülleri enfeksiyonla savaşan beyaz kan hücreleri üretirler. Şişmiş nodüller bazen koltuk altında, boyunda ve kasıkta hissedilir (54, 55). Lenf sistemi ayrıca dalak ve timüs gibi organlara sahiptir (Şekil 2) (54).



Şekil 2. Lenf sistemi ve organları (Bupa'dan, 47)

4.3.2. Lenfoma

Lenfoma, immün sistemin bileşenlerinden olan B ve T lenfositlerinin ve natural killer (NK) hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelmektedir. Lenfoma tanısı

konulan hastaların beş yıllık yaşam süresi yaklaşık %70 olup tahmini olarak 2012 yılında Amerika’da tanı konulan 80 000 civarında hastanın %25’i lenfoma nedeniyle ölmesi beklenmektedir (12).

Hastalık yüksek derecede heterojenite göstermektedir. Genel olarak Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin’s lenfoma olarak iki alt gruba ayrılan lenfoma, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) sınıflandırmasına göre 30’dan fazla alt türe ayrılmaktadır ve bu alt grupların ayırımının yapılması zordur. Tedavi protokollerinin belirlenmesinde alt grup ayırımının yapılması büyük bir öneme sahiptir ve günümüzde alt grupların sınıflandırılmasına yönelik yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir (13, 14).

4.3.2.1. Hodgkin Lenfoma (HL)

İlk olarak 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmış bir kanser tipidir (56). Hodgkin Lenfoma B lenfositlerinden türeyen bir lenfoma türüdür. HL’de dokudaki tümör hücreleri, Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücreleri (HRS) olarak adlandırılırlar ve non-hodgkin lenfomadan tek farklı yönleridir. HRS hücreleri olgun B-lenfositlerinden gelişmektedir fakat fenotipleri tamamen farklıdır ve farklı hemapoetik hücrelerin markırlarını eksprese ederler. Bu hücreler transkripsiyon faktörleri ve sinyal yollarının aktivasyonu olmadan çoğalırlar. Lenfoma gelişiminde ayrıca Epstein –Barr virüslerinin de etkidi olduğu düşünülmektedir (57). Malignant bir tür olan HL, periferik lenf nodüllerine geçebilir ayrıca karaciğer, akciğer ve kemik iliğini etkileyebilir (58). HL tüm lenfomaların yaklaşık %10’unu oluşturmaktadır (35).

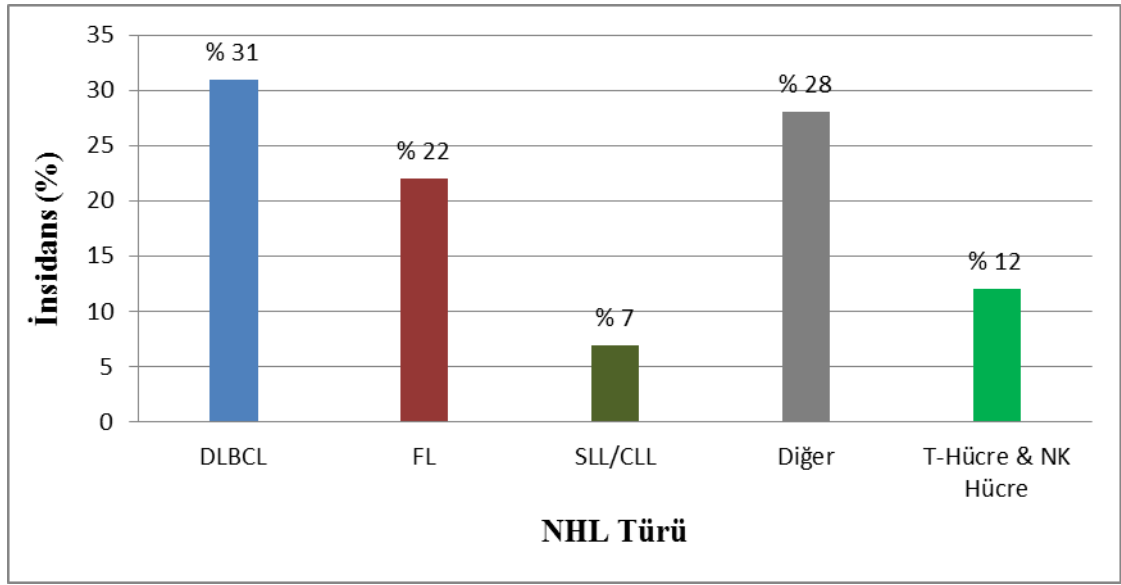
HL patogenezinde rol alan genetik lezyonlar tam anlaşılmamış ve çok heterojendir. Fakat meydana gelen transformasyonlar genellikle NF- κ B ve JAK/STAT sinyal yollarını etkilemektedir (58).

4.3.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma (NHL)

Non-Hodgkin lenfoma B lenfositleri, T lenfositleri ve NK hücrelerinden köken alan lenfomanın farklı bir grubudur. Amerika’da her yıl yaklaşık 65 000 yeni vaka tanımlanmakta ve bunların %30’dan fazlası NHL nedeniyle ölmektedir. ABD’de en sık görülen kanserler arasında yedinci sıradadır ve tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %3’ünü oluşturmaktadır (35, 59). Çeşitli kromozomal anormallikler t(14;18), t(8;14) ve *MUC1*, *BIRC5* gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar lenfoma ile ilişkilendirilmiştir (60).

Ayrıca yapılan çalışmalarda NHL hastalarının yaklaşık %6'sında HIV virüsüne rastlanmıştır (61). Lemfomagenesiste görev rol alan onkogenik yolların anlaşılması ve bu yollarda görev yapan proteinlerin aydınlatılmasına gerek duyulmaktadır (62).

NHL'ların yaklaşık %85'i B-lenfositlerden gelişmektedir. Geriye kalan kısım ise T hücre ve NK hücrelerinden gelişir. En fazla görülen NHL tipleri ise difüz büyük B-hücre lenfoması (DLBCL) (%31) ve foliküler lenfoma (FL) (%22)'dir (Şekil 3) (59).



Şekil 3. Non-Hodgkin lenfomanın alt türlerinin insidansı, DLBCL: Difüz büyük B- Hücre lenfoması, FL: Foliküler Lenfoma, SLL/CLL: Kronik Lenfositik Lösemi / Küçük Lenfositik Lenfoma, NK: Natural Killer Hücre Lenfoması (Rummel'den, 35)

- 1. Difüz Büyük B-Hücre Lenfoması (DLBCL):** NHL türleri arasında en sık gözlenen ve agresivitesi en yüksek olan alt türdür (63). Hastalığın insidansı son yıllarla yaşla doğru orantılı olarak artmakta ve ilerleyen yıllarda artmaya devam edeceği düşünülmektedir (64). Kemoterapi bugün dünyada başvurulan ilk tedavi yöntemidir. Hastalığın tekrar nüksetmesi durumunda, periferik kök hücre nakli tedavi için denlenmektedir (15, 16). DLBCL hastalarının %35'inde 3q27 bölgesinde translokasyon meydana gelmektedir. Bu kromozomal anomali genellikle *Bcl-6* genini etkilemektedir. *Bcl-6* lenfosit aktivasyonu, farklılaşma ve apoptoz yollarında görev yapmaktadır. Bu nedenle *Bcl-6* DLBCL için

potansiyel terapötik hedef olarak kabul edilmektedir (65). Hastalığın tedavisinin geliştirilmesi açısından *Bcl-6* gibi biyomarkır adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır.

2. Foliküler Lenfoma (FL): Lenfomanın DLBCL'den sonra en sık görülen alt türüdür (59, 66). B-hücre lenfomalarının agresif olmayan türüdür (63). Tanımlanamayan sebeplerle hastalığın insidansı gittikçe artmaktadır. Konvansiyonel karyotipleme ile gözlemlenen bir kromozomal düzensizlik olan t(14;18) (q32;q21) gibi bazı genetik bozuklukların hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Translokasyon 18.kromozomda bulunan *Bcl-2* kırılma bölgesinde olmaktadır ve 14.kromozomda bulunan *IgH* hafif zincir bölgesini etkilemektedir. Bunun sonucunda *Bcl-2* onkogeni düzensiz olarak aktive olur. *Bcl-2* antiapoptotik özelliği vardır ve kemoterapiye direnci artırmaktadır (67). Hastalık tedavi edilemez olarak kabul edilse de, erken aşamada tanısı konulduğunda tedaviye son derece duyarlıdır. İlerlemiş safhada yapılan tedavi sonrasında hastalığın nüksetme olasılığı yüksektir. Etkin bir tedavi için yeni biyolojik hedefler bulmaya yönelik yapılacak çalışmalar yaşam kalitesini ve başarıyı artırmak açısından önemli bir yere sahiptir (66).

3. Kronik Lenfositik Lösemi (CLL) / Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL): B hücre lenfomalarının en sık görülen türlerinden birisi olan CLL tedavisi zor olan bir hastalıktır. Tanıdan sonra ki yaşam süresi birkaç ay ya da senelerce sürebilmektedir. İmmunoglobülin ağır zinciri değişken genlerinde, *TP53* ve *β 2-mikrotübilin* geni gibi genlerde mutasyonlar, zeta-zincir-ilişkili protein kinaz 70 (*ZAP70*) ekspresyonu, metafazda kompleks karyotip gibi çeşitli genomik farklılıklar hastalığın prognozunu farklı olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle tedavi farklı gruplarda değişken olmaktadır. Etkin tedavi için değişken gruplara yönelik farklı stratejiler ve hedeflere ihtiyaç vardır (68, 69).

4.3.2.3. Lenfoma Tanı ve Tedavisi

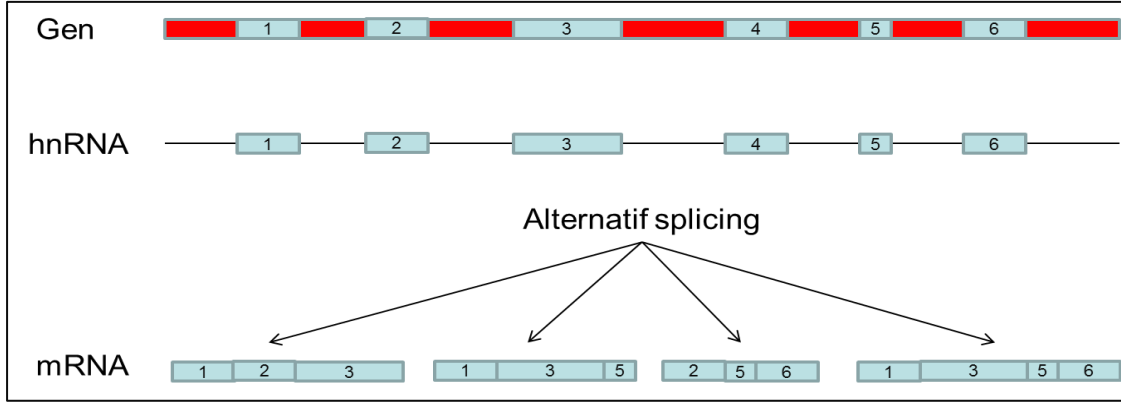
Lenfoma tedavisinde genellikle kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak kemik iliği nakli çalışmaları da yapılmaktadır. Fakat tüm hastalar için pozitif sonuçlar elde edilememektedir (15, 16). Ayrıca genç hastalara uygulanan kemoterapi sonrası birçok yan etki ortaya çıkmakta ve ilerleyen

yaşlarda farklı malignansiler gelişebilmektedir. Bu bakımdan hastalığın daha etkin tedavisi ve tedavinin yan etkilerinin azaltılması için yeni yöntemler gereklidir (17).

Lenfoma tanı ve tedavisi açısından birçok gelişme olmasına rağmen, çok sayıda hastada kesin bir tedavi hala mümkün olmamaktadır. Klinik öncesi çalışmalar ve lenfomanın moleküler biyolojisinin anlamaya yönelik çalışmalar; yeni terapötik ajanlar ve hedeflerin bulunmasına öncülük etmektedir. Bulunan bu yeni hedefler normal tedaviye cevap vermeyen hastalara umut ışığı olmaktadır. Buna ek olarak monoklonal antikor teknolojisi sayesinde lenfoma hücreleri yüzeyindeki antijenlerin direk olarak hedeflenmesi sağlanmaktadır. Bu bağlamda bulunabilecek yeni spesifik markırlar hastalığın tanı ve tedavisinin yanında alt türlerin sınıflandırılmasında önemli bir yere sahip olacaktır (18).

4.4. Alternatif Splising

Alternatif splising (AS), öncül transkriptin farklı organizasyonlarıyla yapısal ve fonksiyonel olarak farklı mesajcı RNA (mRNA)'lar oluşturmaktır (Şekil 4). İnsan genom projesinden sonra, proteomik farklılaşmanın en önemli mekanizmalarından birisinin alternatif splising olduğu gözlenmiştir (70). Tahmini olarak tüm insan genlerinin %35-%94'ü en az bir splise varyantı oluşturmaktadır (24). Oluşan splise varyantları hücrede farklı dokularda farklı protein-protein ilişkilerine, farklı hücresel lokalizasyonlara ve katalitik aktivitelere sahiptirler. Ayrıca birçok çalışma ile bu olayın kanseri de içeren birçok hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır. İnsan genomundaki bir mutasyona bağlı gelişen hastalıkların yarısından fazlasına splising mutasyonları neden olmaktadır (70, 71).



Şekil 4. Alternatif splicing sonucu farklı transkriptlerin oluşması, hnRNA; Heterojen nükleer RNA, mRNA; Mesajcı RNA (Brinkman'dan, 55)

Alternatif splicing ile onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin ve apoptotik genlerin çeşitli varyantları oluşmaktadır (23). Bu varyantlar, karsinogeneze ve tümör gelişiminde rol oynamaktadırlar (23).

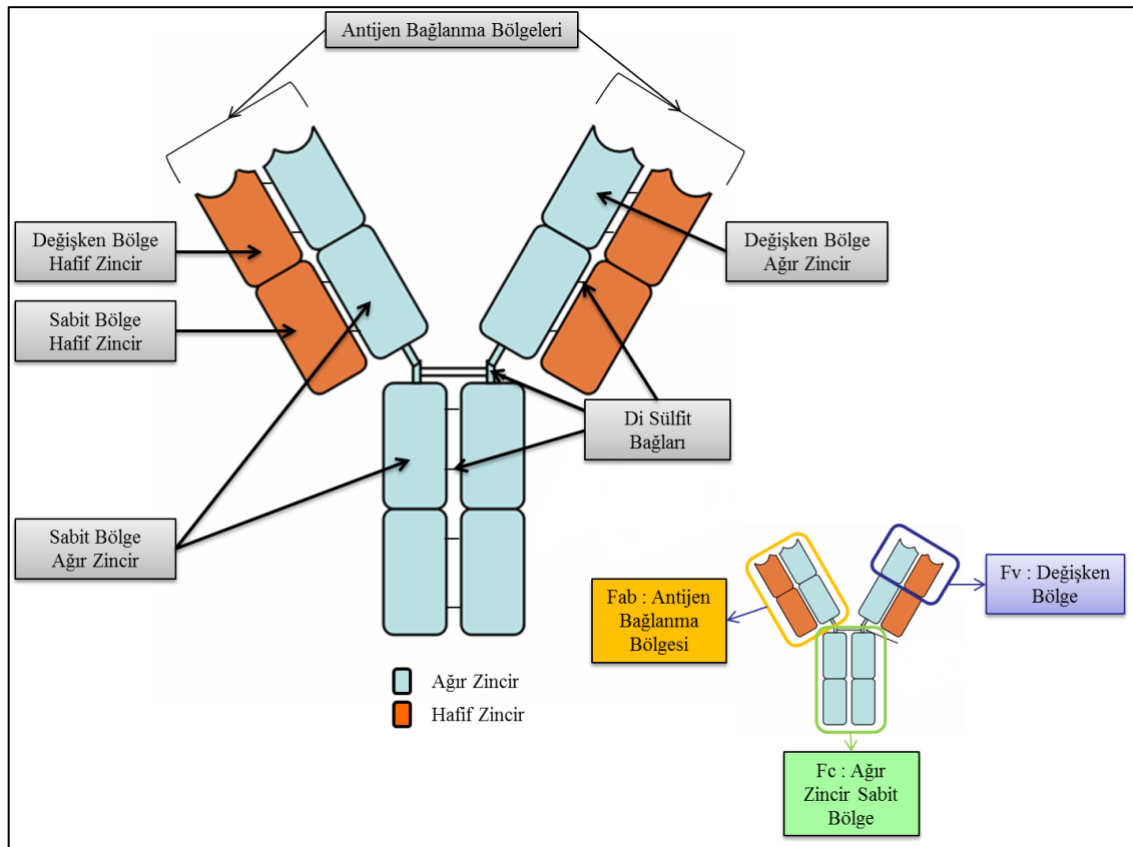
Günümüzde bazı proteinlerin ve bu proteinlerin varyantlarının farklı ekspresyon seviyeleri, çeşitli kanser türlerinde; tanının konulması, prognoz takibi ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi gibi süreçlerde potansiyel biyomarkör olarak kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde saptanan markörlerin bazıları kan plazmasında bulunmaktadır ve bu markörler erken tanı açısından çok daha önemlidirler (19, 24, 25). Örneğin, Pankreas kanserinde CXC Chemokine Ligand 7 (CXCL7) proteininin plazmadaki seviyesinin düştüğü gösterilmiştir ve bu potansiyel bir biyomarkör olarak görülmektedir (20).

4.5. Antikorlar (İmmüoglobulinler)(Ig)

Antikorlar vücuttaki yabancı antijenleri tanıyıp nötralize etmek üzere, B-lenfositleri tarafından üretilen protein yapılarıdır (72, 73). Yapısal olarak Y harfine benzemektedirler (Şekil 5). İnsanlarda Fc (Fragment Costant) bölgesine göre beş farklı (IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD) izotip vardır. Bu bölge ağır zincir diye adlandırılan sabit bölgedir. Ayrıca her bir antikor özgü olduğu antijene bağlanmasını sağlayan değişken bölge bulundurmaktadır. Hafif zincir olarakta adlandırılmaktadır. Bu bölge antijenlerin epitoplarına bağlanmaya yararken, kostant bölge ise efektör hücrelere ve moleküllere bağlanmada görev yapar (Şekil 5) (72). İzotipler vücudun farklı bölgelerinde farklı görevlerde bulunur. IgA, mukozal bölgelerde bulunur patojenlerin koloni oluşturmalarını

engeller (74). IgD, B hücrelerinde antijen reseptörü olarak görev yapar. Bazofil mast hücrelerini aktive ederek antimikrobiyal faktörler üretimini tetikler (75). IgE, alerjenlere bağlanarak mast hücrelerinden histamin salınımını tetikler (73). IgG, patojenlerle savaşmak için antikor tabanlı immünite sağlar. Ayrıca plasentadan geçebilen ve fetusa pasif immünite sağlayan tek antikordur (73). IgM, B hücrelerinin yüzeyinde sentezlenir pentamer formunda bulunur ve humoral immünitenin erken safhasında patojenleri elimine eder (76).

IgG antikorları sahip oldukları özelliğe bağlı olarak western blot, antikor mikroarray ve ELISA gibi yöntemlerde etkin bir biçimde kullanılmaktadırlar (73, 77, 78).

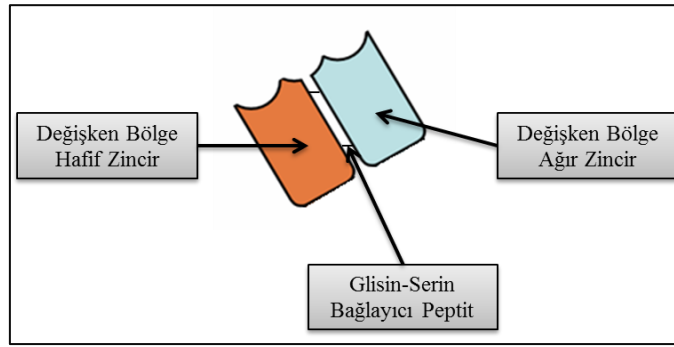


Şekil 5. Antikorların yapısı ve bölgeleri (Pier'den, 60)

4.5.1. Tek Zincir Fragment Variable (ScFv) Antikorları

ScFv antikorları ağır ve hafif zincirin değişken bölgelerinin glisin-serin bağlayıcı peptit (15-25 kDa) tarafından birbirine bağlanmasıyla oluşan rekombinant füzyon proteinlerdir (79, 80). Doğal antikorun spesifik bölgesine (değişken bölge) sahip olan ancak sabit bölgesi olmayan halidir (Şekil 6). Bu tür antikorların üretiminde *E. coli* bakterisi kullanılmaktadır. Antikorların ağır ve hafif zinciri bakteriye klonlanarak değişken bölge protein ekspresyonu gerçekleştirilmektedir (81).

Bunlar küçük proteinler olmaları sebebiyle dokuların içine girmeleri (penetrasyon) ve uzun süre kalmaları açısından biyolojik çalışmalarda etkin bir biçimde kullanılmaktadırlar (82).



Şekil 6. ScFv antikotlarının yapısı (Hust'dan, 62)

4.6. Western Blot Yöntemi

Antikorların validasyonu; biyomarkır araştırmaları için olmazsa olmaz bir parametredir. Biyomarkırın tanınması ve özgünlüğünün kontrolü, klinik çalışmalarda kullanılabilirliğini artırmaktadır (78).

Bir antikorun kalite ve özgünlüğünün kontrolü için western blotlama tekniği en sık kullanılan yöntemdir. Kontrol için western blotta kompleks protein örnekleri kullanılır. Tahmin edilen moleküler ağırlıkta beklenen bant veren antikorlar, spesifik olarak tanımlanır (78).

Çeşitli western blotlama yöntemleri bulunmaktadır. Fakat temelde western blot dört aşamadan oluşur (78).

1. Kompleks protein karışımının elektroforez ile ayrılması.
2. Protein örneklerinin membrana (PVDF, Nitrosetüloz, Naylon gibi) transferi.
3. Membranın bloklanması ve ilgilenilen proteine özgü antikorla tatbik edilmesi.
4. İlgili proteinin immünokimyasal, floresan ya da kolorimetrik yöntemlerle belirlenmesi.

4.7. Mikroarray

Mikroarray tek bir çip üzerinde çok sayıda biyolojik materyalin taranmasını imkan veren bir yaklaşımdır. Yöntem ilk olarak 1983 yılında tanımlanmış olup (83) 1990'lerden sonra endüstriyel olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mikroarray yönteminin en yaygın olarak kullanıldığı alan DNA analiz yöntemleridir. Bunun yanında Antikor mikroarray, protein mikroarray, doku mikroarray, peptid mikroarray gibi farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Günümüzde kanserle ilişkili biyomarkır taramalarında antikor mikroarray en fazla kullanılan yaklaşımdır (21).

4.7.1. Antikor Mikroarray Yöntemi

Çok sayıda proteinin varlığının ve ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde etkin ve kolay bir yöntem olan antikor mikroarray teknolojisi, son zamanlarda kanserin erken tanısında kullanılabilecek biyomarkırların araştırılmasında önemli bir yer edinmiştir (21).

Antikor mikroarray teknolojisi; uygun materyallerden (cam, silikon, plastik) yapılmış platformlar (çip) üzerine spotlar halinde yerleştirilen antikorlarla, serum, doku, üre veya hücre lizatlarında bu antikorlara özgü proteinlerin ekspresyon seviyelerini belirlemeyi hedefleyen bir yaklaşımdır. Çok düşük miktarlarda örnek kullanarak yüzlerce farklı proteinin ekspresyon analizinin yapılmasına olanak sağlayan antikor mikroarray teknolojisi, son yıllarda proteomik çalışmalar için önemli bir araç haline gelmiştir (84). Bu teknolojinin diğer avantajları ise kompleks protein örneklerinin kullanımı, örnek çeşitliliği (kültür hücreleri, plasma, serum, doku vb.) ve yüksek oranda duyarlı olmasıdır. Ayrıca bu örnekler kullanıldığı halde pahalı ve proteinle çalışmayı zorlaştırıcı ön aşamalara gereksinim duyulmamaktadır (85).

Antikor mikroarray teknolojisinde kullanılan yarışmacı ikili sistem (iki renkli antikor mikroarray) aynı anda hem normal hem de kanser örneklerinin ekspresyon

taramasının yapılmasını sağlamaktadır. İki farklı örnek veya örnek grubu farklı floresan boyalarla işaretlenerek, çipler aynı anda tatbik edilmektedir. Aynı antikora iki farklı (kontrol ve kanser) lizatta bulunan farklı boyalarla işaretlenmiş antijenler bağlanmaktadır. Bu bağlanma ilgili proteinlerin kontrol ve kanser grubundaki ekspresyon seviyeleriyle doğru orantılı olarak gerçekleşmektedir. Floresan ışımların sinyal yoğunluğu bu şekilde karşılaştırılarak ekspresyon seviyeleri kontrol edilmektedir (85).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grupları ve Serum Örnekleri

Bu tez, Ekim 2011- Ocak 2013 yılları LLP Erasmus Programı kapsamında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün desteği ile Almanya'nın Heidelberg Üniversitesi'ne bağlı Alman Kanser Araştırma Merkezinin Fonksiyonel Genom Analiz Bölümünde (DKFZ Functional Genome Analysis, Heidelberg University, GERMANY) gerçekleştirildi.

Çalışma, Pankreas kanseri ve Lenfoma olmak üzere iki grupta kurgulandı. Pankreas kanseri grubunda; pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK) tanısı konulmuş 5 hasta, kronik pankreatitis (KP) tanısı konulmuş 5 hasta değerlendirmeye alındı ve bu hastalardan alınan serum örnekleri kullanıldı. Pankreas grubu için sağlıklı 5 bireyden alınan serum örnekleri kontrol maksatlı kullanıldı. Lenfoma grubu için ise; Non-hodgkin lenfomanın 3 farklı alt türüne ait [Difüz Büyük B Hücre Lenfoması (DLBCL), Foliküler Lenfoma (FL) ve Kronik Lenfositik Lökemiya (CLL)] tanısı konulmuş bireyler çalışmaya dahil edildi. Her bir grup için 17 bireyden serum örneği alındı. Lenfoma grubu ile yapılacak çalışmalarda, kontrol grubu olarak kullanılmak üzere sağlıklı 17 bireyden serum örneği alındı.

Pankreas grubu serum örnekleri Dr. Tanja Crnogorac-Jurcevic (Barts Cancer Institute-London / England) ve Dr. Eithne Costello-Goldring (Department of Oncology, Liverpool University, Liverpool/ England) tarafından "European EU FP6 program MolDiagPaca" (ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/docs/diagnostics_en.pdf) programı kapsamında toplanmıştır. Lenfoma grubunda değerlendirilen serum örnekleri ise Dr. Alexandra Nieters (German Cancer Research Centre–Heidelberg/Germany) tarafından çok merkezli bir durum kontrol çalışması kapsamında toplanmıştır (26).

Örnekler, ilgili merkezlere başvuran hastaların onayı ile toplanarak, Prof. Dr. Dr. h. c. M. V. Büchler ve Prof. Dr. med. J. Werner tarafından Alman Kanser Araştırma Merkezi (DKFZ) bünyesinde kurulan kan ve plazma bankasında depolanmıştır. Çalışma Heidelberg Üniversitesi Etik Komisyonu'nun 28.12.2007 tarih 159/2002 sayılı kararı ile onaylanmıştır. (Etik kurul onayı ektedir).

5.1.2. Splise Varyant Antikorlarının Test Edilmesinde Kullanılan Örnekler

Çalışma kapsamında değerlendirmeye alınan splise varyantlarına karşı üretilen antikorlar ilk aşamada Western Blot yöntemi ile test edildi. Antikorların test edilmesi aşamasında western blotlama da normal karaciğer dokusu, karaciğer kanseri dokusu, normal pankreas hücre hattı (HPDE) ve pankreas kanseri hücre hattı (Panc1) kullanıldı. Sağlıklı ve kanserli karaciğer dokusu protein örnekleri ve pankreatik hücre hatları aynı laboratuvarında bulunan diğer çalışma gruplarından elde edilmiştir.

5.1.3. Kimyasallar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Ürün	Şirket	Ürün Kodu
6-amino kaproik asit	ROTH	K929.1
Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	J.T. BAKER	9835830001
Amonyum persülfat (APS)	Applichem	A1356,0500
Bovine Serum Albumin	SIGMA	A9647-100G
Sitrik asit monohidrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)	GENNAXXON	M.3274.1000
DTT (DL- dithiothreitol)	SIGMA	D0632-106
Dubleco's PBS	GIBCO	14040
Etanol (C ₂ H ₅ O)	SIGMA	32205-2,5L
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	SIGMA	085K0124
EZBlue Jel Boyama Solusyonu	SIGMA	61041-
Gliserol	Roth	4043.1
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	SIGMA	67126-1KG
Hidro klorik asit (HCl)	SIGMA	H1758
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	SIGMA	59300
Magnesium chloride 6 hidrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	SIGMA	M9272-100G
Metanol	SIGMA	32213-2,5ML
N,N,N',N' - tetramethylethylenediamid (TEMED)	BIO-RAD	161-0800
N,N-Dimetil formamit	ROTH	A529.1
Nonyl phenoxypolyethoxylethanol (NP40)	SIGMA	74385
Ponceau S	SERVA	33427.01
Restore Western Blot. Stripping Buffer	Thermo Sci.	21059
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	SIGMA	P0662
Roti [®] Load 1 (4 x)	ROTH	K929.1
Rotiphorse (Akrilamid/Bisakrilamid)	Roth	3029.1
Süt tozu	SIGMA	70166
Sodyum Klorür (NaCl)	CALBIOCHEM	D00016984
Sodyum II hidrojen fosfat II hidrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	NeoLab	4820.0250
Sodyum II hidrojen fosfat hidrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	ROTH	K300.2
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Gerbu	1212
Sodyum Florür (NaF)	SIGMA	075K0129
Sodyum Hidroksit (NaOH)	SIGMA	71689
Sodium Orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	SIGMA	450243-106
Tris-HCl	SIGMA	T3253-5KG
Triton X-100	SIGMA	T8787
Tween 20	SIGMA	P1379
Water	Sterilized	
Zinc Chloride (ZnCl ₂)	KELLER	8816

5.1.4. Kitler

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kitlerin listesi

Ürün	Şirket	Ürün Kodu
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Sci.	23227
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Sci.	32132
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Sci.	78501
Spectra Multi Color Protein Ladder	Thermo Sci.	26625

5.1.5. Cihazlar

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Şirket
Otomatik Film Makinesi	Amersham, Almanya
Beckman GS-6KR Santrifüj	Beckmann, Almanya
Santrifüj 5810 R	Eppendorf, Almanya
Santrifüj 580R	Eppendorf, Almanya
Elektroforez Güç Kaynağı	E-C Apparatus Corporation, USA
Mikro- Santrifüj	NeoLab, Almanya
Mini-PROTEAN® 4'lü Elektroforez Sistemi	Bio-Rad Laboratories, Almanya
Termocycle	MJ Research, USA
Vorteks	Scientific Ind Genie-2, USA
Rotamax 120 Çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
Hoefer TE 70 Yarı Kuru Trans. Ünitesi	Amersham Bio, USA
pH Metre (MP230)	Mettler Toledo, İsviçre
Tartı	Kern, Almanya
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Çalkalayıcı ES-KL-2	NeoLab, Almanya
Dolap (+ 4)	Bosch, Almanya
Dondurucu (- 20)	Bosch, Almanya
Dondurucu (- 80)	Sanyo, Almanya
Biofuge Pico	Hereaus, Almanya
Mikro-plate Okuyucu (M200)	Tecan, İsviçre

5.1.6. Sarf Malzemeleri

Tablo 6. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerinin listesi

Malzeme	Şirket	Ülke
CL-Xposure Film	Thermo Sci.	Almanya
Nitroselüloz Membran	NeoLab	Almanya
Jel Kurutma Çerçeveleri	Roth	Almanya
Falkon Tüpler	BD Falcon	Almanya
Pipet Uçları	STAR LAB	Almanya
Mikro Santrifüj Tüpleri	Eppendorf	Almanya
Whatmann Kağıtları	BioRad	USA
Forsep		

5.1.7. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Proteinler

Çalışma kapsamında değerlendirilmek üzere üç farklı protein grubu belirlendi. Birinci grupta, kanserli dokularda alternatif splising varyantlarının olduğu rapor edilmiş olan 46 protein ve bu proteinlerin 54 splise varyantı değerlendirildi (Tablo 7). Literatür taraması ile oluşturulan bu grup çalışma kapsamında “splising grubu” olarak adlandırıldı. İkinci grupta ise karsinogenesis ile ilgili yollarda görev aldığı bilinen 31 protein değerlendirildi (Tablo 8). Bu proteinler çalışma kapsamında “karsinogenesis ilişkili grup” olarak adlandırıldı.

5.1.8. Antikorlar

5.1.8.1. Splise Varyant Antikorları

Splising grubunda değerlendirmeye alınan 100 proteinin her biri için iki farklı poliklonal antikor kullanıldı. Antikorlar Genscript (NJ, USA) firmasına özel olarak ürettirildi. Antikorların üretiminde konak olarak tavşanlar kullanıldı.

Tablo 7. Çalışmada değerlendirilen proteinler, y: yüksek ekspresyon, d: düşük ekspresyon, EKS: Ekspresyon seviyesi

No	Protein	Varyant	İlişkili kanser	Değişiklik	EKS
1	Rac1	Rac1b	Kolorektal Kanser	19 aa. Girişi	Y
2	TFPI2	asTFPI2	Karaciğer ve akciğer K.	Komplike	Y
3	CCKBR	CCKBRisv	Kolorektal Kanser	İntron 4 içeriyor	Y
4	MDM2	MDM2b	Ovaryum ve Kan Kanseri	Komplike	Y
5	HDMX	HDMX(S)	Sarkoma	Ekzon 6 kaybı	Y
6	crkI	CrkII	Glioblastoma	C Terminalde 300bp kayıp	Y
7	MIIP45	MIIP45S	Glioma	Ekzon 7 kaybına bağlı çerçeve kayması	Y
8	LRRFIB 1	LRRFIB 2	Kolorektal Kanser	Ekzon kaybı	Y
9	CYP1A1	CYP1A1v	Ovaryum Kanseri HH	Ekzon 2'nin intronunda 84-bp'lık kayıp	Y
10	Trka	Trka111	Nöroblastoma	6,7 ve 9. ekzonun kaybı	Y
11	XBP	XBP1-1S	Meme Kanseri	Çerçeve kayması	Y
12	PCBP4	PCBPα	Akciğer kanseri	Ekzon kaybı	Y
13	Syk	Syk(s)	Neoplastik Meme Dokusu	23 aminoasitlik kayıp	Y
14	BIRC5	BIRC5 (2B)	Renal hücre karsinoma	İntron 2'nin parçası	Y
		BIRC5 (DEx3)		Ekzon 3 yok	
15	CXCR3	CXCR3B	Renal Kanser	Komplike	D
16	AML1b(RUN X)	AML1bDel	Ovaryum Kanseri	6. Ekzon kaybı	Y
17	FGFR3	FGFR3111S	Nöroblastoma	Ekzon 9, 10 ve 7'den 30 bp kaybı	Y
18	Cyclin D1	Cyclin D1b	Akciğer kanseri	Ekzon 4 kaybı	Y
19	L1-cadherin	svL1-cadherin	Hepatocellular Karsinoma	Ekzon 7 kaybı	Y
20	Tert	Tert-alpha	Prostat Kanseri	12 aminoasitlik kayıp	Y
21	RIPK3	RIPK3 gamma	Kolon ve akciğer kanseri	Komplike	Y
22	TP73	TP73 exon2	Prostat Kanseri	Ekzon 2'yi içerir	D
		TP73-13		Ekzon 13 Kaybı	Y
23	HAS1	HAS1va	Multiple myeloma	Komplike	Y
		HAS1vb		Ekzon kaybı	
24	FGFR2	FGFR2 _3	Uterus ve mide	Ekzon 8 kaybı	Y
25	COL6A3-Ex6	COL6A3+Ex6	Kolon Kanseri	Ekzon 6 kaybı	Y
26	caLD1-567	caLD1-Ex6	Kolon Kanseri	Ekzon 6 kaybı	D
		caLD1+5ext	Kolon Prostat	Ekzon 5 kaybı	
27	VINC (- Ek19)	VINC1 (+Ek19)	Kolon Kanseri	Ekzon 19 kaybı	D
28	ACTN1 19a	ACTN1 19b	Kolon Kanseri	Ekzon 19 kaybı	D
29	NGLY1	NGLY1-Ex10	Uterus ve akciğer	Ekzon 10 kaybı	Y

Tablo 7. Çalışmada değerlendirilen proteinler (Devam)

No	Protein	Varyant	İlişkili kanser	Değişiklik	EKS
30	TPM16a	TPM16b	Uterus ve akciğer	Ekzon 6 kaybı	Y
31	ITB4	ITB4-4B	Uterus ve akciğer	Ekzon 34 kaybı	D
32	DNMT3B	DNMT3B-2	Meme ve Ovaryum Kanseri	Ekzon 20 ve 21 kaybı	Y
33	APP (A4)	APP-57	Ovaryum Kanseri	Ekzon kaybı	D
34	MCL1	MCL1+248	Ovaryum Kanseri	Ekzon kaybı	Y
35	DDR	DDR+37AA	Meme Kanseri	10. ekzonda ekstra 37 aa	Y
36	PLD1	PLD1b	Neoplastic tissue(Liver,lung and colon)	Ekzon kaybı	D
37	ADAM15	ADAM15-147	Meme kanseri	147 bp kaybı	D
38	VLDLR	VLDLR-28AA	Meme kanseri	28 aa kaybı	D
39	KLF6	KLF6SV1	Prostat Kanseri	IVSI-27g>a	Y
40	HMMR	HMMR-45	Ovaryum Kanseri	45 bp kaybı	D
41	SCF (KITLG)	SCF (KILG-84)	Kolon kanseri	Ekzon 5 kaybı	Y
42	PTPN13	PTPN13+57	Ovaryum Kanseri	57 bp fazla	Y
43	IRF	IRFv1	Servikal kanser	Ekzon 9 kaybı	Y
		IRFv2		Ekzon 7,8 kaybı	Y
		IRFv3		Ekzon 8,9 kaybı	Y
44	CD44	CD44v6	Kolorektal Kanser	Komplike	Y
		CD44s	Meme ve Ovaryum Kanseri		
		CD44+9,10			
45	GLI1	GLI1v	Ovaryum kanseri	Komplike	Y
46	ARM10	ARM10-2	Ovaryum kanseri	Komplike	Y

5.1.8.2. Karsinogenesis İlişkili Grup için Kullanılan Antikorlar.

Karsinogenesis ilişkili grup içinde seçilen 31 proteinin her bir için 1-8 arasında değişen toplam 76 antikor kullanıldı. Bu grupta kullanılan antikorlar rekombinant yöntemlerle üretilmiş olan “single chain variable fragment” (ScFv) antikorlardan oluşmaktadır. Bu antikorlar çalışmaya özel olarak Braunschweig Teknik Üniversitesi’ne (Technische Universität Braunschweig) bağlı Antibody Factory’de üretilirdi (Braunschweig, Germany).

Tablo 8. Kanserle ilişkili oldukları bilinen ScFv antikorları

No	Antikor	Kullanılan antikor Sayısı
1	ASGR1	2
2	BMX	4
3	CD40 (Peptid49/Peptid50)	1
4	GAK	2
5	hSMAD2 (29phosphoS465/467a) (30phosphoS465/467a)	8
6	IL-6	1
7	JNK2 (MAPK 9)	6
8	PRKAR2A	4
9	PRKAR2B	2
10	MAPK1 / ERK2	3
11	MAPK11 / p38 beta	2
12	MAPK12 / p38 gamma	2
13	MAPK13 / p38 delta	1
14	MAPK8 (JNK1)	3
15	MKK4 (MAPKK 4)	4
16	MKK6	1
17	OTUB2	1
18	p38alpha	1
19	PRKAR1B	2
20	RAC1	3
21	SH21A	2
22	SHC4	1
23	SMAD 3	2
24	SMAD2 (29dephosphoS465/467a)	8
25	SMAD2 DQQ Peptid (?)	1
26	SMAD3	1
27	SMAD4	4
28	SMAD7	1
29	TGFR2	1
30	TNR5	1
31	STAP2	1

5.1.8.3. Validasyon Antikorları

Bu grup antikorlar çiplerin validasyonunda kullanılmak üzere seçilen 6 adet proteine özgü ticari antikorlardan oluşmaktadır (Tablo 9). Bu antikorlar, üretici firma tarafından özgünlükleri gösterilmiş ve çalışmalarda yaygın olarak kullanılan antikorlar arasından seçilmiştir.

Tablo 9. Ticari olarak satın alınan antikorlar.

No	Protein	Antikorlar	Şirket	Katolog No
1	IGF	Anti-IGF	Dianova, Almanya	CYT-74875
2	LYAM	Anti-LYAM	Dianova, Almanya	CYT-75097
3	MMP7	Anti-MMP7	Dianova, Almanya	DLN-11054
4	S10A6	Anti-S10A6	Sigma-Aldrich	HPA007575
5	WHOLE SERUM	Anti-WHOLE SERUM	Dianova, Almanya	301-001-001
6	CHTB_VIBCH	Anti-CHTB_VIBCH	MyBioSource,USA	MBS211979

5.1.8.4. İkincil Antikorlar

Çalışmada dört adet ikincil antikor kullanıldı (Tablo 10). Bunlardan floresan (Cy3 ve Cy5) işaretli olanlar çiplerin validasyonu ve pozisyonel kontrol için kullanıldı. HRP konjüğe olan antikorlar ise westen blot çalışmalarında kemilüminesan görüntülerin alınmasında kullanıldı.

Tablo 10. İkincil (Sekonder) antikorlar

No	Antikorlar	Şirket
1	Anti Mouse IgG Cy3 Konjüke	Dianova,Almanya
2	Anti Rabbit IgG Cy5 Konjüke	Dianova,Almanya
3	Anti Rabbit IgG HRP Konjüke	Dianova,Almanya
4	Anti Mause IgG HRP Konjüke	Dianova,Almanya

5.1.9. Solüsyonlar

5.1.9.1. SDS PAGE Elektroforez Solüsyonları

a) 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Ayırma Jel Tamponu)(200 mL)

44.2 g Tris HCl

Hazırlanışı:

44.2 g Tris HCl 180 ml deiyonize suda çözöldü, pH 8.8 e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

b) 1.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Yökleme Jel Tamponu) (100 mL)

22.1 g Tris HCl

Hazırlanışı:

22.1 g Tris HCl 90 ml deiyonize suda çözöldü, pH 6.8 e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

c) %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (20 mL)

2 g SDS

Hazırlanışı:

2 g SDS 20 ml deiyonize suda çözölerək oda sıcaklığında saklandı.

d) SDS-PAGE Tank Tamponu (1 L) (10 X)

30.3 g Tris HCl

144 g Glisin

10 g SDS

Hazırlanışı:

30.3 g Tris HCl, 144 g glisin ve 10 g SDS (% 0.1 w/v) 1 litre deiyonize suda çözölerək oda sıcaklığında saklandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

e) %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

100 mg APS

Hazırlanışı:

100 mg APS 1 ml deiyonize suda çözüldü. Artı dört derecede (+4 °C'de) saklandı.

f) 4 X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Ticari olarak satın alınan Roti Load[®] 4 X kullanıldı, alikotlanarak oda sıcaklığında saklandı.

g) % 30 Akrilamid\Bisakrilamid

Ticari (Rotipharose Gel 30) kullanıldı ve 2-8 °C'de saklandı.

5.1.9.2. Western Blot ve Görüntüleme Solüsyonları

a) Western Blot Anot I (500 ml)

18.2 g Tris HCl
100 ml Metanol

Hazırlanışı:

18.2 g Tris HCl ve 100 ml metanol çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

b) Western Blot Anot II (500 ml)

1.5 g Tris HCl
100 ml Metanol

Hazırlanışı:

1.5 g Tris HCl ve 100 ml metanol çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

c) Western Blot Katot (500 ml)

2.6 g	6-amiokaproik asit
100 ml	Metanol

Hazırlanışı:

2.6 g 6-amiokaproik asit ve 100 ml metanol çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

d) 10 X TBS

31.52 g	Tris HCl
80 g	NaCl

Hazırlanışı:

31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı pH 7.6 ya ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

e) TBST (1 L)

100 ml	10xTBS
1 ml	Tween 20

Hazırlanışı:

100 ml 10 x TBS ve 1 ml Tween 20 1 litre (L) deiyonize suda dilue edildi.

f) %5 BSA-TBST / SÜT TOZU-TBST (Bloklama Solüsyonu)

5 g BSA ya da Süt tozu

Hazırlanışı:

5 g BSA veya süt tozu 100 ml TBST içerisinde çözülerek 4 °C'de saklanır. Gerekli durumda BSA ve Süt tozu birlikte kullanılabilir.

5.1.9.3. Mikroarray Solusyonları

a) 2 x Spotlama Tamponu

0.21g	Sodyum bikarbonat
0.29g	Sodyum klorür
12.5 µl	Dextran
0.40 g	Magnezyum klorür 6 hidrat
3 µg	Igepal
5 µg	Sodyum III nitrit

Hazırlanışı:

0.21 g Sodyum bikarbonat, 0.29 g Sodyum klorür, 12.5 µl Dextran , 0.40 g Magnezyum klorür 6 hidrat, 3 µg Igepal ve 5 µg Sodyum III nitrit çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı ve -20 °C'de saklandı.

b) 10 x PBS Stoğu (3 L)

41.34g	Sodyum II hidrojen fosfat II hidrat
9.2g	Potasyum fosfat
240g	Sodyum klorür
3g	Sodyum III nitrit

Hazırlanışı:

41.34 g Sodyum II hidrojen fosfat II hidrat, 9.2 g Potasyum fosfat, 240 g Sodyum klorür ve 3 g Sodyum III nitrit çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 3 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

c) 0.1 x PBS

10 ml stok PBS deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

d) PBS, % 0.05 Tween 20

100 ml	PBS (10 x)
5 ml	Tween 20

Hazırlanışı:

100 ml 10 x PBS ve 5 ml Tween 20 çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

e) PBS, % 0.05 Tween 20, % 0.05 Triton X-100

100 ml	PBS (10 x)
5 ml	Tween 20
5 ml	Triton X-100

Hazırlanışı:

100 ml 10 x PBS, 5 ml Triton X-100 ve 5 ml Tween 20 çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

f) % 1 Triton X-100

1 g	Triton X-100
-----	--------------

Hazırlanışı:

1 g Triton X-100 suda çözülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

g) 1 M Sodyum Bikarbonat Solüsyonu

84 g	Sodyum bikarbonat
------	-------------------

Hazırlanışı:

84 g Sodyum bikarbonat suda çözülerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı ve alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Örneklerin Hazırlanması

5.2.2. Hücre Hatlarından Protein İzolasyonu

1. Panc1 ve HPDE pelletleri ilk olarak 50 ml falkonda DPBS ile 1 kez yıkandı.
2. Hücreler 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
3. Pellet yoğunluğuna göre hücrelerin üzerine M-PER protein lizis solüsyonu eklendi.
 - Konfluent T175 flaskı için 1 ml.
 - Konfluent T25 flaskı için 100 µl.
4. Pellet 1 ml şırınga yardımıyla süspanse hale getirilerek hücrelerin patlaması sağlandı (Pellet homojen hale gelinceye kadar aşağı yukarı yapılarak).
5. Daha sonra süspansiyon buz üzerinde yarım saat 70 rpm' de çalkalandı.
6. Yarım saat (30 dk) sonunda süspansiyon 1,5 ml eppendorf tüpe alındı.
7. Süspansiyon +4 °C' de 10 dk 12000 rpm' de santrifüj edildi.
8. Proteinleri içeren süpernatant, hücre artıklarını içeren pellete dokunmadan yeni bir eppendorf tüpe alındı.
9. Bu aşamadan sonra protein konsantrasyonları ölçüldü.

5.2.3. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Tüm protein örneklerinin konsantrasyonları BCA (bicinchoninic acid) kiti kullanılarak ölçüldü. BCA proteinlerin asidik ortamda Cu^{+2} iyonlarını Cu^{+1} iyonlarına dönüştürmesi baz alınarak protein konsantrasyonunu yüksek duyarlılıkla ölçen bir sistemdir. Ölçüm kitin önerdiği protokole göre aşağıdaki gibi yapıldı. İlk olarak örneklerin konsantrasyonunun belirlenmesinde yardımcı olmak üzere bovin serum albümin (BSA) kullanılarak 0 µg/ml (Blank) ile 2 000 µg/ml konsantrasyonları arasında standartlar oluşturuldu (Tablo 11).

Tablo 11. BSA standartlarının oluşturulması

Tüpler	Diluent (PBS ya da Lizis Sol.) (µl)	BSA(Stok: 2mg/ml) (µl)	Son Konsantrasyon (µg/ml)
T1	0	300 (Stok)	2000
T2	125	375 (Stok)	1500
T3	325	325 (Stok)	1000
T4	175	175 (T2'den)	750
T5	325	325 (T3'den)	500
T6	325	325 (T5'den)	250
T7	325	325 (T6'den)	125
T8	400	100 (T7'den)	25
T9	400	0	Blank

5.2.3.2. Ölçümün Yapılması

1. Kit solüsyonları solüsyon A ile solüsyon B sırasıyla 50'ye 1 oranında ölçülecek örnek sayısına göre hazırlandı.
2. Her bir örnek için 200 µl kit solüsyonu kullanıldı.
3. Standartlar 25 µl, örnekler ise 10 µl olarak 96 kuyucuklu plate'e yüklendi. Daha verimli sonuç için her bir örneğin konsantrasyonu iki kez ölçülerek ölçümlerin ortalaması alındı.
4. Örnek ve standart yüklenen kuyucuklara 200 µl solüsyon eklendi.
5. Plate 37 °C'de yarım saat (30 dk) inkübasyona bırakıldı.
6. Yarım saat sonunda örneklerin 562 nm'deki absorbanı TECAN Plate Reader ile okundu.
7. Standartların absorbanları ile oluşturulan standart eğri grafiği baz alınarak her bir örneğin protein konsantrasyonu hesaplandı.

5.2.4. Protein Örneklerinin Konsantrasyonlarının Ayarlanması

BCA kiti ile ölçülen örneklerin konsantrasyonları; mikroarray çalışmalarında kullanılmak üzere tüm serum örneklerinin konsantrasyonları PBS ile beraber 5 mg/ml olarak ayarlanırken, western blotlama da kullanılacak doku ve hücre hattı örneklerinin konsantrasyonları lizis solüsyonu ile 1 mg/ml olacak şekilde ayarlandı.

5.2.5. Örneklerin Western Blotlama İçin Denatürasyonu

Protein konsantrasyonları 1 mg/ml olarak ayarlanan hücre hattı (HPDE, Panc1) ve doku (Karaciğer, Karaciğer Kanseri) örnekleri üzerine ticari olarak satın alınan 4 x yükleme tamponu (Son hacmi 1 x olacak şekilde) eklendi. Daha sonra örnekler 95 °C’de 5 dk denatürasyona bırakıldı. 5 dk sonunda denatüre olan örnekler western blotlama için kullanılmak üzere alikotlanarak -20 °C’de saklandı.

5.2.6. Serum Havuzlarının Oluşturulması

Her iki kanser ile ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere elimizdeki hasta örneklerinin karışımı ile aşağıdaki havuzlar oluşturuldu. Oluşturulan her havuz tablolarla belirtilen sayıdaki örneklerin aynı miktarda karışımıyla hazırlandı (Tablo12) (Tablo13).

Tablo 12. Alt tür havuzları

Havuz Kodu	Havuzlar	Örnek Sayısı
H_1	FL Havuzu	20
H_2	CLL Havuzu	20
H_3	DLBCL Havuzu	63
H_4	PDAK Havuzu (PK)	24
H_5	KP Havuzu	9
H_NR	Normal Birey Havuzu	40

Tablo 13. Kanser (Referans) havuzları

Havuz Kodu	Havuzlar	Örnekler	Toplam Örnek
H_P	Pankreas Havuzu	KP+PDAK+Normal	15
H_N	Lenfoma Havuzu	FL+CLL+DLBCL+Normal	68

5.2.7. Örneklerin ve Havuzların Floresan Boyalarla İşaretlenmesi

Kalite kontrol ve ön tarama aşamasında kullanılan referans havuzları ve alt tür havuzları hem Cy3 hem de Cy5 floresan boyası ile işaretlendi.

Markır taramasında kullanılan kişisel serum örneklerinin her biri ise Cy5 ile işaretlendi. Bu örneklerle karşı tarama da referans olarak Cy3 ile işaretlenmiş Pankreas havuzu ve Lenfoma havuzu kullanıldı.

İşaretleme reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleşti.

1. Protein konsantrasyonları ölçülüp 5 mg/ml ayarlanan serum örnekleri (son konsantrasyon 4 mg/ml olacak şekilde) ve 250 µl %1 Triton X-100 ve 100 mM sodyum bikarbonat içerisinde 400 mM boya vorteks üzerinde 2 saat +4 °C’de inkübasyona bırakıldı.
2. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için toplam hacmi 1 M olacak şekilde hidroksil amin boya-serum karışımının üzerine eklendi ve yine +4 °C’de 20 dk vorteks üzerinde inkübasyona bırakıldı.
3. 20 dk sonunda örnekler üzerine son konsantrasyonu 1 x olacak şekilde proteaz fosfataz inhibitör kokteyli eklendi ve direkt ışıktan korunarak -20 °C’de saklandı.

5.2.8. SDS-PAGE Hazırlığı

Önemli Notlar

- Jeller sağlığa zararlı kimyasallar (TEMED gibi) içerdiğinden tüm aşamalar kabin içinde yapıldı ve eldiven kullanıldı.
- Çeşitli protein kontaminasyonları engellemek için tüm camlar ve zemin %70’lik etanolle dezenfekte edildi.
- Camlar kullanıldıktan sonra öncelikle sıcak suyla yıkandı. Daha sonra distile sudan geçirilerek kurutuldu. Bu hem jel artıklarını ve kalıntıların temizlenmesini sağladı.
- Camlar kurutulurken birbirine değdirilmedi.
- Jel dökümü sırasında eğer ikiden fazla jel aynı anda hazırlanacaksa hazırlanan karışım TEMED eklenmeden önce 5’er ml olacak şekilde ayrılarak TEMED ayrı ayrı eklendi (Jellerin aynı olabilmeleri için).

5.2.8.1. SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması

1. Camlar kontaminasyonları veya jel kalıntılarını engellemek için %70’lik etil alkol ile temizlendi.

2. Ayrıca western blotlama sonrasında camlar ilk olarak sıcak suyla yıkanır ve jel kalıntıları mümkün olduğunca temizlendi.
3. Ardından distile su ile durulandı.
4. Temizlenen camlar peçete kullanılarak kurutuldu.
5. Bir sonraki çalışma için aralarına peçete konularak saklandı.

5.2.8.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

a). Ayırma Jelinin Dökülmesi

1. Gereksinim duyulan ayırma jeli yüzdesine göre jellerin hazırlanması için gerekli olan kimyasallar kabin içerisine yerleştirildi.
2. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi.
3. Bu sırada jelin alt kısımdan sızması için dikkatli olundu.
4. Kimyasallar aşağıdaki içerik listesinde verilen sıraya göre 50 ml falkonda karıştırıldı istenilen yüzdeye göre hazırlanır (Tablo 14).
5. SDS ve APS ekledikten sonra falkon karışımın homojen hale gelmesi için dairesel biçimde bir hareket yapılarak karıştırıldı.
6. Polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED eklenmeden önce jeli dökmek için kullanılacak pipet 1 ml'e ayarlandı.
7. TEMED eklendikten sonra birkaç kez pipetaj yapılarak TEMED'in homojen bir biçimde yayılması sağlandı.
8. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı.
9. Hazırlanan karışım camlar arasına hava kabarcığı bırakmadan aktarıldı.
10. Jel kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına kadar eklendi.
11. Bu kısma **soğuk izopropanal** eklenerek üst kısmın düz bir şekilde polimerleşmesi sağlandı.
12. Falkonda arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk).

Tablo 14. Ayırma jeli içeriği

Malzemeler	%10	%12	%15
ddH ₂ O	2.00 ml	1.70 ml	1.20 ml
Acrylamid (30% acrylamid mix)	1.65 ml	2.00 ml	2.50 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
10% SDS	100 µL	100 µL	100 µL
10% APS	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	6.7 µL	6.7 µL	6.7 µL
Toplam	5 ml	5 ml	5 ml

b). Yükleme jelinin dökülmesi

1. Ayırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol (bütanol su karışımı da olabilir) dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki izopropanol kağıt mendile emdirilerek jelin üzerinden alındı.
2. Hazırlanan yükleme jeli (Tablo 15) hızlı biçimde camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı.
3. Alkolle dezenfekte edilen tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildi.
4. Polimerizasyon için beklendi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk).

Tablo 15. Yükleme jeli içeriği

Malzemeler	%5
ddH ₂ O	1.50 ml
Acrylamid (30% acrylamid mix)	0.65 ml
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.35 ml
10% SDS	25 µL
10% APS	50 µL
TEMED	3 µL
Toplam	5 ml

5.2.9. SDS-PAGE Jellerinin Elektroforezi

5.2.9.1. Hazırlanan Jelin Tanklara Yerleştirilmesi

1. Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirildi.
2. Tank soluysonu belirtilen noktalara kadar dolduruldu.
3. Tarak solusyon doldurulduktan sonra kuyucuklara zarar vermeden çıkartıldı.
4. Jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi.

5.2.9.2. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

1. Yürütülecek proteinlerin konsantrasyonları ölçülerek ayarlandı.
2. Örneklerin üzerine uygun miktarda yükleme solüsyonu eklendi. Yükleme solüsyonunun son konsantrasyonunun 1 x olması sağlandı.
3. Örnek-Yükleme Solüsyonu karışımı 95 °C'de 5 dk kaynatıldı (denatürasyon).
4. Kuyucuklara maximum 10 µg örnek yüklendi (BioRad 15 X kuyu için).
5. Kuyucuklara maximum 20-25 µg örnek yüklendi (BioRad 10 X kuyu için).
6. Genellikle ilk ve son kuyuya markır yüklendi.
7. Örnekler 135 Voltta (500mA, 150W) yaklaşık 1-1.5 (60-90 dk) saat yürütülür. Yürüme; markırın yürüme hızı kontrol edilerek ayarlandı.
8. Markır renkli değil ise boya kontrol edilerek yürüme zamanı ayarlandı (Bromfenol Mavisi 10 kDa ile yürür).

5.2.10. Western Blot (Semi Dry Sistem)

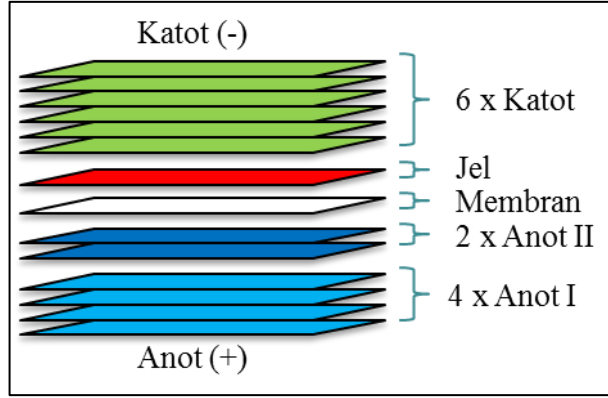
Önemli Notlar

- Metanolün zararlı olmasından dolayı kabin içinde çalışıldı.
- Jel tanktan çıkarıldıktan sonra birkaç dakikalığına soğutuldu.
- Membrana el ile dokunulmadı. Pens kullanıldı.
- Bütün aşamalarda hava boşluğu bırakmamaya özen gösterildi.

a) Üç Tamponlu Sistem:

Blotlama için 12 tane ince Watmann kağıdı kullanıldı.

1. Kâğıtlara hazırlanan 3 farklı solüsyon emdirildi.
 - 4 kağıt Anot 1 ile
 - 2 kağıt Anot 2 ile
 - 6 kağıt katot ile
2. Jel camlardan ayrılmadan önce mümkün olduğunca anot 2 solüsyonu ile ıslak hale getirildi.
3. Spatula iki cam arasına sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı.
4. Jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı.
5. Jelin sağ alt tarafında işaretlemek amacıyla hafifçe kesildi. Bu jelin western blot yapılırken doğru şekilde yerleştirilmesine yardımcı oldu.
6. Anot 1 solüsyonu ile ıslatılan kâğıtlar ve ardından anot 2 solüsyonu ile ıslatılan kâğıtlar cihaza yerleştirildi.
7. Daha sonra anot 2 solüsyonu ile aktive edilen membran (5-10 sn) kâğıtların üzerine yerleştirildi (Membran ile kâğıtlar arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi).
8. Membranın üstüne daha önce işaretlenen jel uygun biçimde yerleştirildi (Membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi).
9. Son olarak katot ile ıslatılmış kâğıtlar jelin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek sandviç oluşturuldu (Şekil 7).
10. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir hafif basınç uygulanarak sandviç üzerinde yuvarlandı.
11. Western blot 35 Volttan 1 saat (500mA,150W) yürütüldü.



Şekil 7. Sandviç oluşumu

5.2.11. Western Blot'ın Kontrolü

1. 1 saat sonunda membran etil alkolle temizlenmiş bir kaba alındı.
2. Ponceau red boyasıyla boyanarak western blot kontrol edildi.
3. Bu aşamadan sonra, son aşamaya kadar membranın kurumamasına dikkat edildi.

5.2.12. Membran Üzerindeki Proteinlerin Görüntülenmesi

Önemli Notlar

Antikorlar gerekli miktarda falkon içerisinde üreticinin tavsiyesine göre dilue edildi. Genellikle birincil antikorlar 1:1 000 oranında dilue edilirken, ikincil antikorlar 1:10 000 oranında sulandırıldı.

5.2.12.1. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

1. Bloklama için hazırlanan 10 ml bloklama solüsyonu 50 ml falkon içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat roller mikserde inkübasyona bırakılır.
2. Bloklamadan sonra eğer aynı membran üzerinde birden fazla antikor kontrol edilecekse membran markır yardımıyla belirlenen uygun bölgelerden kesilerek işaretlendi.
3. Bloklanan membran, daha önce hazırlanmış olan birinci antikor/bloklama (1:1000) solüsyonu içerisinde roller mikserde üzerinde 1 saat oda sıcaklığında ya da over-night inkübe edildi.
4. Birincil antikor inkübasyonundan sonra membran 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

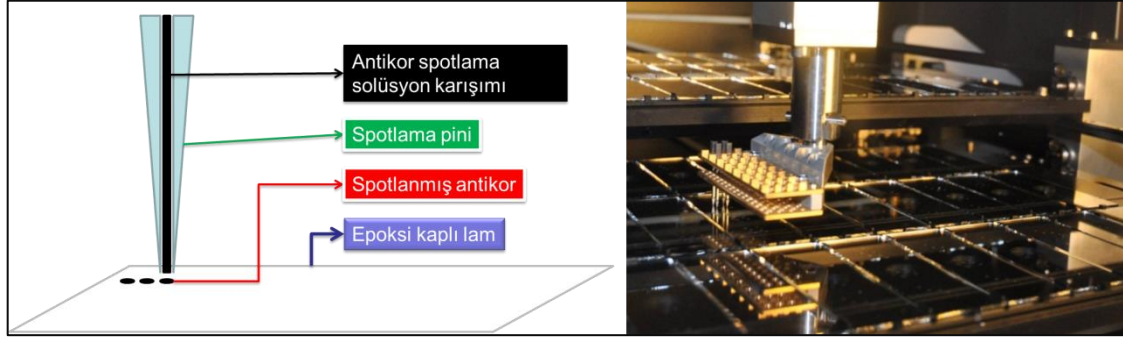
5. Daha sonra membran birincil antikorlara uygun ikincil antikorlarla roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 3 defa 10'ar dk TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
7. Üçüncü yıkamadan sonra membran pens ile kenarından tutularak bir kurulama kağıdı üzerinde kenarından değdirilerek kuruması sağlandı ve temiz bir kaba aktarıldı.
8. İmmünokimya ile saptamak için hazırlanan 1 ml ECL solüsyonu ile muamele edildi (1-2 dk).
9. Daha sonra membran üzerindeki fazla miktardaki ECL karışımını uzaklaştırmak için tekrar kurulama kâğıdı üzerinde kenarından değdirildi.
10. Bu aşamadan sonra film ya da kamera kullanılarak sonuçlar elde edildi.
11. Alınan her bir fotoğraf için inkübasyon süresi (exposure time) kaydedildi.
12. İnkübasyon süresi bantların kalitesine göre artırılıp azaltıldı.
13. Eğer membran tekrar kullanılacaksa TBST içerisinde 4 °C'de saklandı.
14. Membran üzerinde yeni bir antikor kontrolü yapılacaksa membran kazıma (Stripping buffer) solüsyonu kullanılarak aynı aşamalar tekrar farklı antikor için tekrarlandı.

5.2.13. Antikor Mikroarray Çiplerinin Üretilmesi (Antikor Printing)

Antikor mikroarray çipleri üretiminde Epoksi kaplı Nexterion E slaytları kullanıldı. İlk olarak spotlanacak olan bütün antikorlar, pozisyonel ve negatif kontroller de dahil olmak üzere final konsantrasyonu 1 mg/ml olmak üzere 2 x spotlama solüsyonu içerisinde 384 kuyucuklu platelere aktarıldı. Tüm antikorlar ve kontroller kullanılarak hazırlanan plâtelere plate vortexer ile homojen hale getirildikten sonra 1000 g'de 2 dk santrifüjlenip 4 °C'de saklandı.

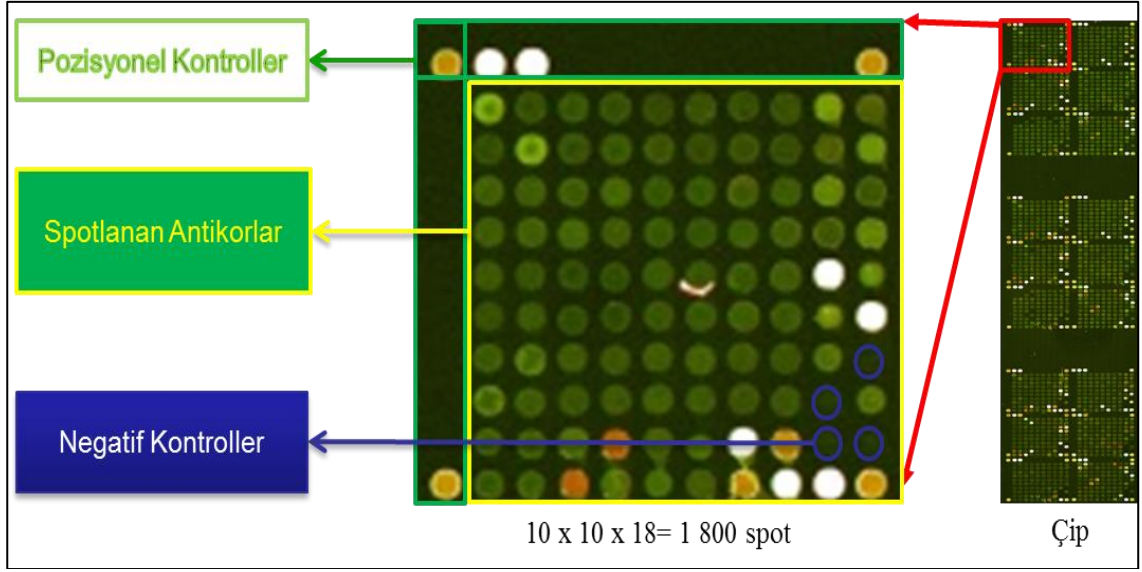
Antikorların slaytlara spotlanması için Micro Grid Spotter (Biorobotics, UK) kullanıldı (Şekil 8). Robotun yıkama solüsyon rezervuarları ve hava nemlendirici bölmeleri saf su ile temizlenip sıcaklığı 10 °C'ye ayarlandı. Spotlama pinleri alkol ve distile su ile temizlenerek uygun bölmelere yerleştirildi. Spotlama kontrolü için 1 mg/ml BSA içeren 1 x spotlama solüsyonu kullanarak bir ön spotlama (2 000 spot) yapıldı. Kontrol sonrasında sistemin çalışmasında herhangi bir sıkıntı görülmedi. Bu aşamadan

sonra ilk olarak 10 adet kalite kontrol amaçlı çip, kalite kontrol testlerinden sonra da 200 adet çip üretildi. Üretim %50 nem altında gerçekleştirildi. Spotlama bittikten sonra çipler karanlıkta O/N bekletildikten sonra kuru şekilde 4 °C’de saklandı.



Şekil 8. Antikorların çiplere spotlanması

Her bir çip üzerine 200 splise varyant antikor, 76 ScFv antikor, 6 tane ticari olarak satın alınan antikor, 2 tane floresan işaretli ikincil antikor ve negatif kontrol olarak BSA olmak üzere 285 farklı spot yapıldı. Splise varyant antikorları ve ScFv antikorları her bir çipte farklı noktalarda olmak üzere 6 kez spotlandı. Sadece 5 µL 2 x spotlama solüsyonu ve 5 µL BSA içeren karışım negatif kontrol olarak, her bir çipte farklı bölgelerde 36 kez spotlandı. Pozisyonel kontrol olarak 5 µl Anti Mause Cy3 ve 5 µl Anti Rabbit Cy5, 5 µl 2 x spotlama solüsyon ile beraber teker teker ve karışık (2.5 µl Cy3+ 2.5 µl Cy5) olmak üzere 126 kez spotlandı. Pozisyonel kontroller slaytların oryantasyonunun belirlenmesi, spotlama bölgesinin tanınması ve resimleme sürecinde yardımcı oldu. Ticari olarak satın alınan antikorlar arasında bulunan ANTI_WHOLE_SERUM antikoru tüm serum proteinlerini bağlaması açısından, karşılaştırması yapılan serum örneklerin normalizasyonu aşamasında kullanıldı. Ayrıca yine ticari olarak satın alınan antikorlar arasında bulunan kolera enterotoksin b alt birimine spesifik (CHTB_VIBCH) antikor, negatif kontrol olarak kullanıldı (Resim 1).



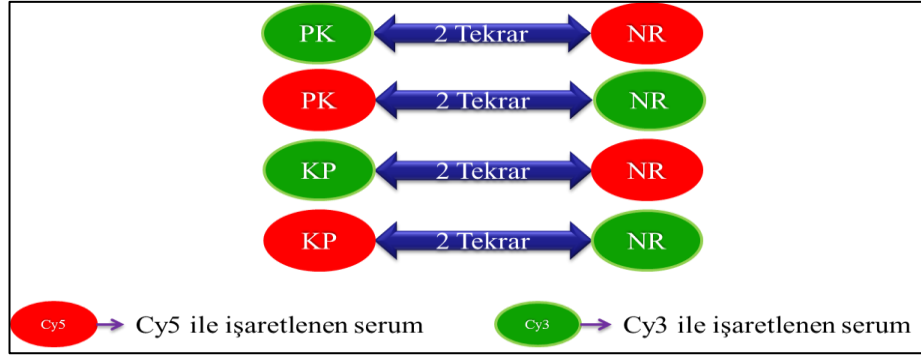
Resim 1. Spotların çip üzerinde tanımlanması

5.2.14.İki Renkli Antikor Mikroarray (Yarışmacı İkili Sistem) Tasarımları

İki renkli sistem için 2 farklı tasarım kullanıldı. Bunlardan birincisi iki farklı örneğin ya da örnek grubunun doğrudan karşılaştırılması, ikincisi ise her bir örneğin referans olarak oluşturulan grupla karşılaştırılması ile oluşturuldu.

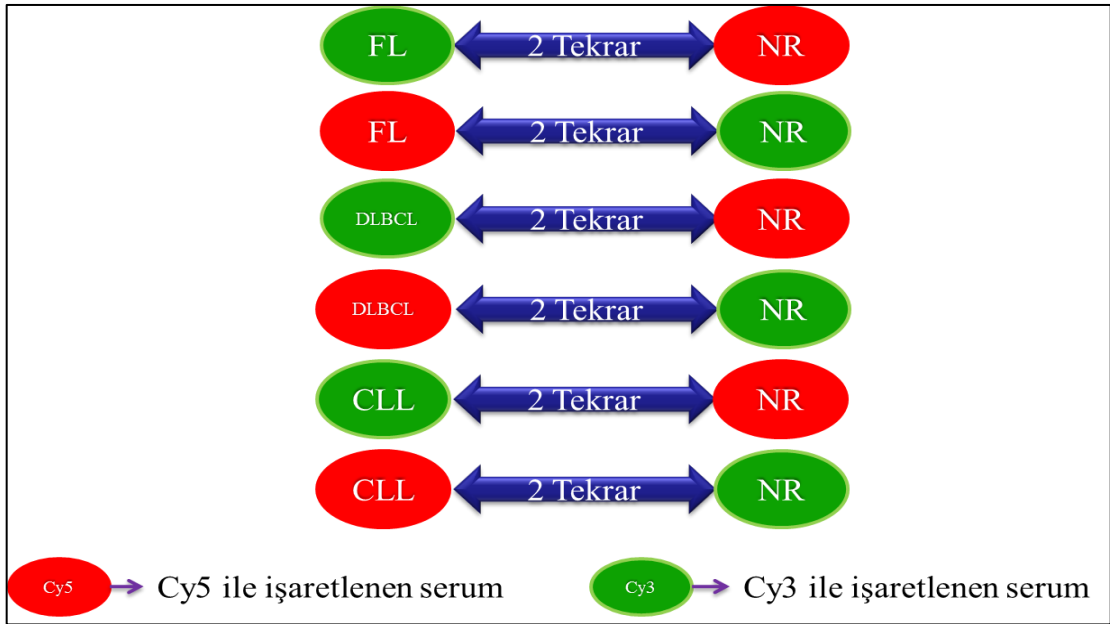
5.2.14.1.Doğrudan Karşılaştırma

İlk olarak direk bir karşılaştırma için, iki farklı örnek ya da örnek tipi farklı floresan boyalarla işaretlenerek aynı çip üzerine tatbik edildi. Bu yöntem üretilen çiplerin kalite kontrolü aşamasında ve her iki kanser türünde de havuzlarla yapılan ön taramalarda kullanıldı. Pankreas grubu ön taramasında H_4 kodlu PK havuzu ve H_5 kodlu KP havuzu H_NR kodlu sağlıklı birey havuzu ile karşılaştırıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Pankreas grubu ön tarama tasarımı

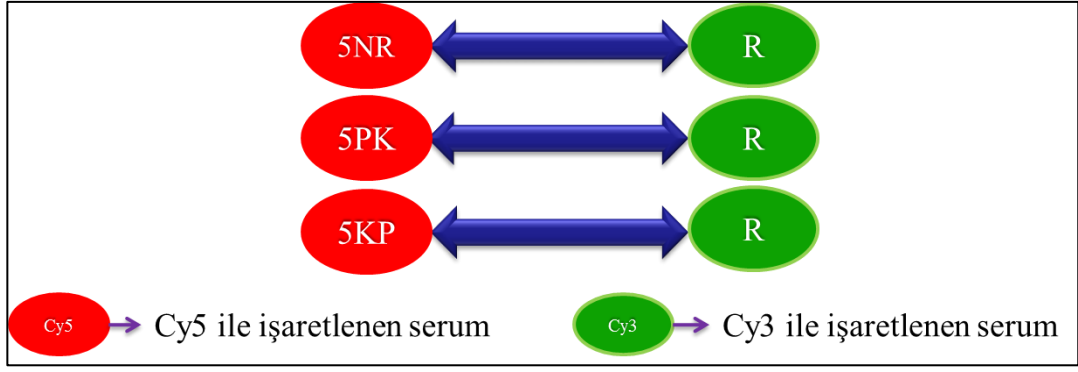
Aynı ön tarama çalışması lenfoma grubu için H_1 kodlu Foliküler lenfoma, H_2 kodlu kronik lenfositik lösemi ve H_3 kodlu difüz büyük B-hücre lenfoması havuzu ile H_NR kodlu sağlıklı birey havuzu doğrudan karşılaştırılarak yapıldı (Şekil 10).



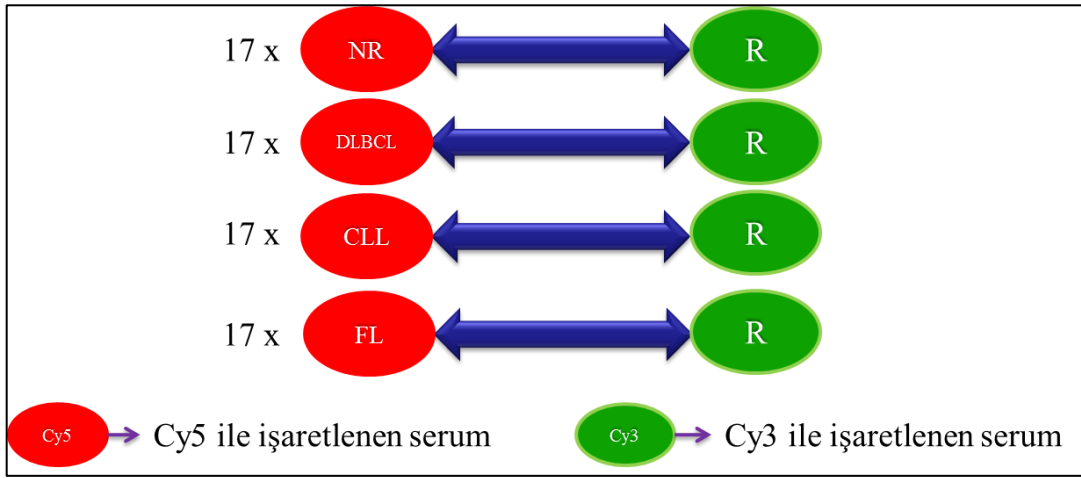
Şekil 10. Lenfoma grubu ön tarama tasarımı

5.2.14.2.Referans Tabanlı Karşılaştırma

Diğer yöntemde ise tüm bireysel örnekler Cy5 boyası ile işaretlenirken, her iki kanser türü için oluşturulan referanslar (H_P ve H_L) Cy3 boyasıyla işaretlendi. Daha sonra örneklerle referans ile aynı çipte hibridize edilerek bireysel örneklerin ekspresyon seviyesindeki farklılıklar araştırıldı (Şekil 11)(Şekil 12).



Şekil 11. Pankreatik kanser için markır taraması tasarımı



Şekil 12. Lenfoma için markır taraması tasarımı

5.2.15. Hibridizasyon

Tasarımı yapılan yarışmacı ikili sistemin hibridizasyon aşaması TECAN HS4800 (TECAN, İsviçre) cihazı ile aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Daha önce kalite kontrolü yapılarak +4 °C’de saklanan çipler cihazın bölmesine yerleştirildi ve azot valfi açıldı.
2. Yıkama ve durulama aşamalarında kullanılan 0.1 x PBS, PBST, PBSTT ve dH₂O 1 litrelik kavanozlarda hazırlandı, cihazın hortumları kavanozların içine yerleştirildi ve her bir hortumun hangi solüsyona bağlı olduğu cihaza tanıtıldı.
3. Çipler ilk olarak PBST ile 90 sn yıkandı.
4. Daha sonra çipler 200 µl ticari bloklama solüsyonu ile 1 saat muamele edildi.
5. Bloklamadan sonra çipler PBSTT ile 20 sn yıkandı ve 15 sn kalan sıvılar emildi.

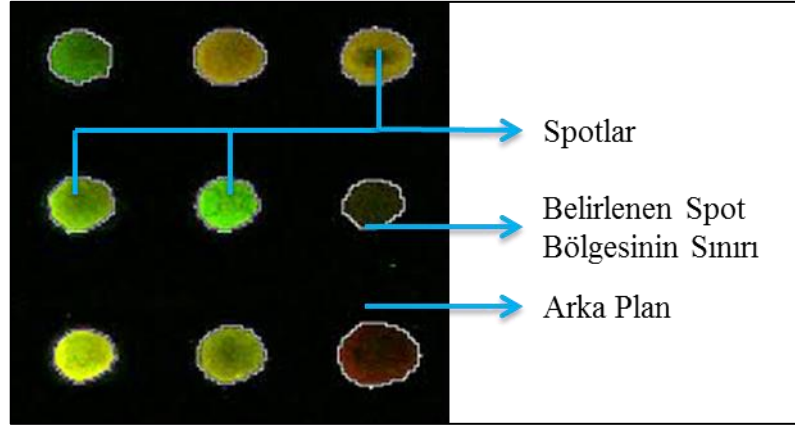
6. Bu aşamadan sonra çipler 10 µl hasta, 10 µl kontrol ve 180 µl bloklama solüsyonu (doğrudan karşılaştırma) ya da 10 µl örnek, 10 µl referans ve 180 µl bloklama solüsyonu (referans tabanlı karşılaştırma) ile yaklaşık 3 saat hibridizasyona bırakıldı.
7. Hibridizasyon sonrasında çipler ilk olarak PBSTT ile sırasıyla 90 sn, 30 sn ve 30 sn olmak üzere 3 kez yıkandı.
8. Ardından 0.1 x PBS yıkandı 30 sn yıkandı ve son olarak dH₂O ile 30 sn durulandı.
9. Tüm bu aşamalardan sonra çipler 5 dk kurutma işlemine tabi tutularak ve fotoğraflama için hazır hale getirildi.

5.2.16. Çiplerin Fotoğraflanması

Çiplerin fotoğraflanması için TECAN Power Scanner (TECAN, Avusturya) cihazı kullanıldı. Çipler cihazın haznesine yerleştirildi. Taraması yapılacak alan cihaza tanıtıldı ve çözünürlük 10 mikrometre (µm) olarak ayarlandı. Lazer gücü ise hem otomatik hem de manuel olarak ayarlandı. Diğer parametreler otomatik olarak kullanıldı ve her bir çipin yüksek kaliteli tiff formatında her iki dalga boyunda (532 nm ve 645nm) fotoğrafları çekildi.

5.2.17. Spotların Tanımlanması

Çiplerdeki her bir antikora (spot) bağlanan iki farklı boyayla işaretli örneklerin yoğunluklarını karşılaştırılması için ilk olarak Genepix Pro 6.0 programı kullanılarak her bir spot bölgesi belirlendi (Resim 2). Spot bölgesi belirlenirken iki dalga boyunda fotoğraflanan her bir çip birleştirilerek yapıldı. Spot olarak tanımlanan her bir alanın sinyal yoğunlukları oranları karşılaştırılarak sayısal bir veri elde edildi. Bu sayısal veriler “.gpr” uzantılı dosyalarda depolandı.



Resim 2. Spotların tanımlanması

5.2.18. Sonuçların Analizi

Oluşturulan “gpr” dosyalarının istatistiksel analizleri R Bioconductor programı kullanılarak Dr. Christoph Schröder tarafından yapıldı. Bu analizler kısaca 3 aşamadan oluşmaktadır.

1. İlk olarak çip üzerinde bulunan Anti Whole Serum antikoru baz alınarak örneklerin normalizasyonu yapıldı.
2. Daha sonra spotlardaki sinyal yoğunluğunun arka plan sinyal yoğunluğuna oranıyla SNR grafikleri oluşturuldu. Bu grafikler çiplerin kalitesinin belirlenmesinde kullanıldı. Kalite iki parametreye bakılarak belirlendi.
 - Sinyal yoğunluk/Arka plan oranlarının 1’den büyük olması.
 - Sinyal yoğunluk ortalamalarının aynı seviyede olması.
3. Kalite kontrolünden geçen çipler ekspresyon analizlerinde kullanıldı.
4. İki farklı grup arasındaki ekspresyon seviyesindeki farklılıklar Empirical Bayes testi ve p-değerlerinin Bonferroni-Hochberg multiple test tanımlama sistemi ile yapıldı. P-değeri 0.05’in altında olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Bu çalışma ile pankreas kanseri ve lenfomanın erken tanısında kullanılabilecek potansiyel biyomarkırların antikor mikroarray yöntemi kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında iki farklı gen grubundan üretilen proteinlerin biyomarkır olup olmayacağı araştırıldı. Birinci grup, farklı kanser türlerinde alternatif splising sonucu varyantlarının oluşturulduğu gösterilmiş olan 46 adet gen temel alınarak oluşturulmuştur. Bu grup içinde yer alan her bir gen tarafından kodlanan splising varyantları hedef olarak seçildi ve bu grup “*splising grubu*” olarak adlandırıldı (Bkz Tablo 7). İkinci grup ise, kanserle ilişkili yolaklarda görev aldığı bilinen proteinler arasından seçilmiş 31 proteinden oluşturulmuştur ve çalışma içinde “*karsinogenezis ilişkili grup*” olarak adlandırılmıştır (Bkz Tablo 8). Splising grubu ve generezis ilişkili grup içinde yer alan proteinlerin pankreas grubundaki ekspresyonları 5’i pankreas kanseri, 5’i kronik pankreatitis, 5’i sağlıklı birey olmak üzere 15 bireyin serum örneklerinde taranmıştır. Lenfoma için ise bu proteinler, 17’si difüz büyük B-hücre lenfoması, 17’si kronik lenfosittik lösemi, 17’si foliküler lenfoma ve 17’si de sağlıklı bireylere ait olan toplam 68 farklı serum örneğinde taranmıştır. Splising grubu proteinlerin ekspresyonlarının taraması, her bir protein için, bu çalışmada kullanılmak üzere üretilmiş iki farklı poliklonal antikor ile gerçekleştirilmiştir. Karsinogenezis ilişkili grup içinde yer alan proteinlerin ekspresyonlarının taraması ise, proteinlere farklı epitoplardan bağlanan toplam 76 single chain variable fragment (ScFv) antikorunu kullanılarak yapılmıştır.

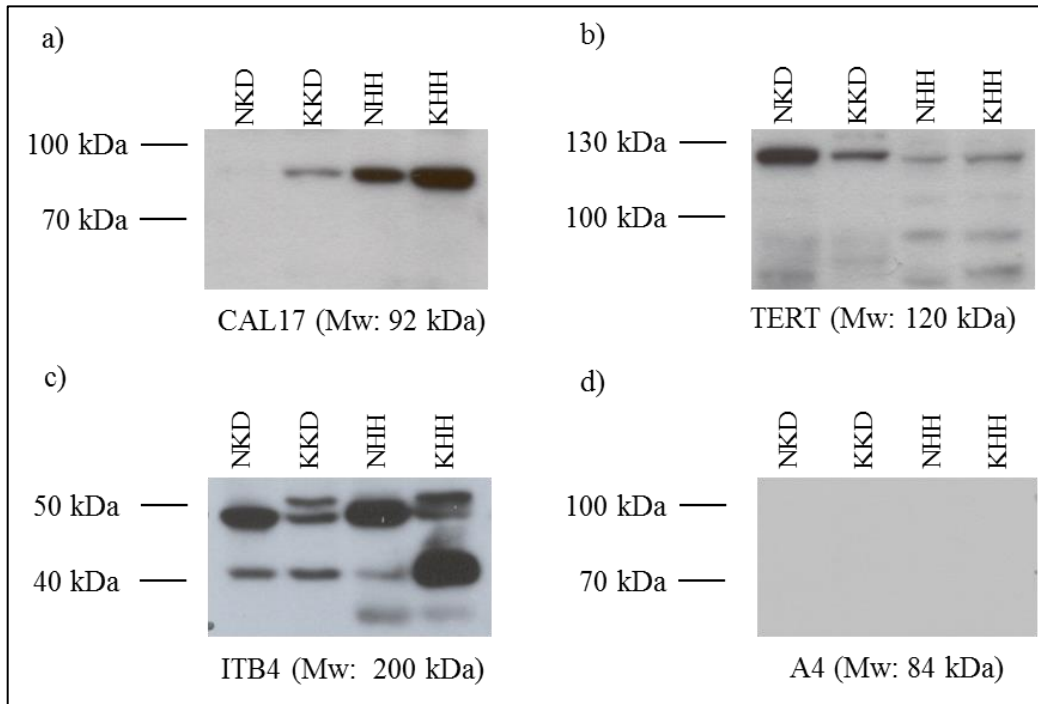
Üretilen her bir splise varyant antikorunun çalışıp çalışmadığı öncelikle western blot yöntemi ile test edildi. Aynı zamanda ilgili genlerin farklı splising varyantlarının olup olmadığı belirlendi. Bu aşamadan sonra bütün antikorlar (200 splise varyant antikor, 76 ScFv antikor) kullanılarak antikor-mikroarray çipleri oluşturuldu ve çalışmaya dahil edilen bütün serum örneklerinin ilgili protein ekspresyon seviyeleri bu çipler ile tarandı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri uygun programlar ile yapıldı.

6.1. Antikorların Western Blot Yöntemi ile Test Edilmesi

Antikorların validasyonu; biyomarkır araştırmaları için olmazsa olmaz bir parametredir. Biyomarkır olarak belirlenen proteinlere özgü antikorların tanımlanması

ve özgünlüğünün kontrolü, klinik çalışmalarda kullanılabilirliklerini artırmaktadır. Bir antikorun kalite ve özgünlüğünün kontrolü için western blotlama tekniği en sık kullanılan yöntemdir (78).

Bu noktadan hareketle çalışma için ürettirilen 200 antikorun özgünlüğü; western blot yöntemi ile sağlıklı karaciğer dokusu, karaciğer kanseri dokusu, normal pankreas hücre hattı ve pankreatik kanser hücre hattından elde edilen hücre lizatlarında test edildi. Beklenen moleküler ağırlıkta, tek bant veren antikorlar “yüksek derecede özgün”, beklenen moleküler ağırlıkta bant ile birlikte farklı moleküler ağırlıkta bantlar veren antikorlar “spesifik”, beklenen moleküler ağırlıkta bant vermeyen, ancak farklı moleküler ağırlıklarda bir ya da birden fazla bant veren antikorlar “non-spesifik” ve herhangi bir bant vermeyen antikorlar “bağlanmayan” olarak sınıflandırıldı (Resim 3).



Resim 3. Western blot sonuçları ile antikorların sınıflandırılması, a) 92 kDa moleküler ağırlıktaki CAL17 proteinine özgü antikorun yüksek derecede özgünlükle bağlanması, b) 120 kDa moleküler ağırlıktaki TERT proteine karşı üretilen antikorun spesifik olarak bağlanması, c) 200 kDa moleküler ağırlıktaki ITB4 proteinine özgü olarak üretilen antikorun non-spesifik bağlanması, d) 84 kDa moleküler ağırlıktaki A4 proteine karşı üretilen antikorun hedefe bağlanmaması, NKD; Normal Karaciğer Dokusu, KKD; Karaciğer Kanser Dokusu, NHH; Normal Hücre Hattı, KHH; Kanser Hücre Hattı

Bu sınıflandırmaya göre çalışma için ürettirilen antikorlardan 33'ü yüksek derecede özgün, 81'i spesifik, 72'si özgün olmayan ve 14'ünün herhangi bir proteine bağlanmadığı görüldü (Tablo 16).

Tablo 16. Splise varyant antikorlarının validasyonu, E: Epitop, Ö: Özgünlük, P: Patern, Y: Yüksek spesifite, S: Spesifik, N; Non-spesifik, B; Bağlanma yok, FP: Farklı patern, AP; Aynı patern

	Protein WT	E	Ö	P	Varyant	E	Ö	P
1	Rac1	1	Y	AP	Rac1b	1	Y	FP
		2	Y	AP		2	N	AP
2	TFPI2	1	S	AP	asTFPI2	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
3	CCKBR	1	Y	FP	CCKBR isv	1	N	AP
		2	Y	AP		2	N	AP
4	MDM2	1	S	AP	MDM2b	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
5	HDMX	1	B	AP	HDMX(S)	1	B	AP
		2	B	AP		2	N	AP
6	crkI	1	N	AP	CrkII	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
7	IIP45	1	N	AP	IIP45S	1	S	AP
		2	N	AP		2	S	AP
8	LRRFIB 1	1	S	AP	LRRFIB 2	1	N	AP
		2	S	AP		2	N	AP
9	CYP1A1	1	Y	FP	CYP1A1v	1	Y	AP
		2	S	AP		2	S	AP
10	Trka	1	Y	AP	Trka111	1	S	AP
		2	N	AP		2	S	AP
11	XBP1	1	S	AP	XBP1_2	1	N	AP
		2	B	AP		2	N	AP
12	poly(rC) 4	1	N	AP	poly(rC)a	1	N	AP
		2	N	AP		2	Y	AP
13	Syk	1	Y	AP	Sky(s)	1	N	AP
		2	S	AP		2	Y	AP
14	BIRC5	1	N	AP	BIRC5_3	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
15	CXCR3	1	N	AP	CXCR3B	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP

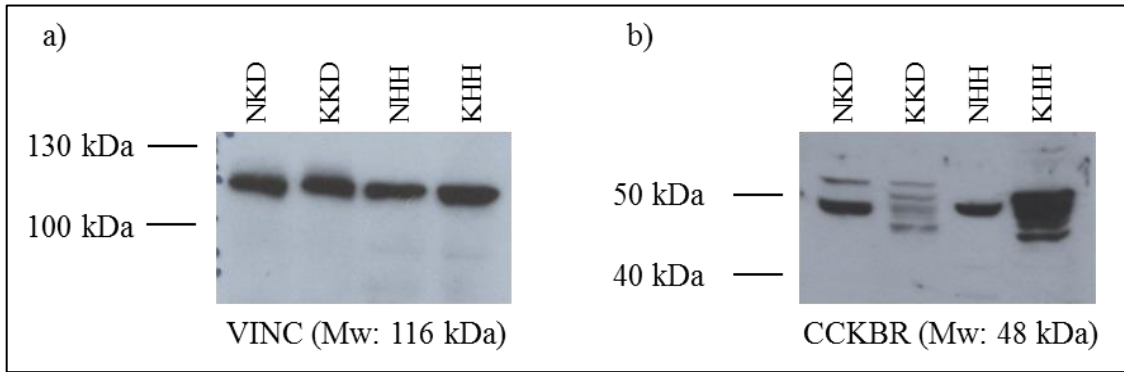
Tablo 16. Splise varyant antikorlarının validasyonu (Devam)

	Protein WT	E	Ö	P	Varyant	E	Ö	P
16	AML1b(three) RUNX	1	Y	AP	AML1bDel RUNX	1	Y	AP
		2	Y	AP		2	Y	AP
17	FGFR3	1	S	AP	FGFR3111S	1	S	AP
		2	S	FP		2	S	AP
18	Cyclin D1	1	S	AP	Cyclin D1b	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
19	L1-cadherin	1	S	AP	svL1-cadherin	1	Y	AP
		2	S	AP		2	N	AP
20	Tert	1	S	AP	Tert-alpha	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
21	RIPK3	1	B	AP	RIPK3 gamma	1	B	AP
		2	Y	AP		2	B	AP
22	P73	1	S	AP	P73 exon2	1	Y	FP
		2	S	AP		2	Y	FP
23	HAS1	1	Y	AP	HAS1b	1	Y	FP
		2	Y	AP		2	Y	AP
24	FGFR2	1	S	FP	FGFR2 _3	1	S	AP
		2	B	AP		2	S	AP
25	COL6A3-Ex6	1	S	AP	COL6A3+Ex6	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
26	caLD1-567	1	S	AP	CALD1skip exon6	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
27	VINC (19 Skipping)	1	Y	AP	VINC1 (19 Including)	1	S	AP
		2	Y	AP		2	Y	AP
28	ACTN1 19a	1	S	AP	ACTN1 19b	1	S	AP
		2	Y	FP		2	S	AP
29	NGLY1	1	N	AP	NGLY1 Skipping 10	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
30	TPM16b	1	Y	AP	TPM16a	1	Y	FP
		2	Y	AP		2	Y	FP
31	ITB4	1	S	FP	ITB4-4B	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
32	DNMT3A	1	N	AP	DNMT3B-2	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
33	APP (A4)	1	N	AP	APP-57	1	B	AP
		2	N	AP		2	B	AP

Tablo 16. Splise varyant antikorlarının validasyonu (Devam)

	Protein WT	E	Ö	P	Varyant	E	Ö	P
34	MCL1	1	N	AP	MCL1+248	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
35	DDR	1	Y	AP	DDR+37AA	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
36	PLD1	1	S	AP	PLD1-114	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
37	ADAM15	1	S	AP	ADAM15-147	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
38	VLDLR	1	B	AP	VLDLR-28AA	1	S	AP
		2	N	AP		2	S	AP
39	KLF6	1	Y	AP	KLF6SV1	1	S	AP
		2	Y	AP		2	N	AP
40	HMMR	1	S	FP	HMMR-45	1	S	FP
		2	S	FP		2	N	AP
41	SCF (KITLG)	1	S	AP	SCF (KITLG-84)	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
42	PTN13	1	S	AP	PTN13+57	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
43	caLD1+5ext	1	N	AP	TP73	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
44	HAS1a	1	N	AP	BIRC5 _3	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
45	IRF	1	N	AP	IRFv1	1	N	AP
		2	N	AP		2	N	AP
46	IRFv2	1	N	AP	IRFv3	1	N	AP
		2	N	AP		2	Y	AP
47	CD44s	1	Y	AP	CD44v6	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
48	CD44s	1	S	AP	CD44+9,10	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP
49	GLI1	1	B	AP	GLI1v	1	B	AP
		2	N	AP		2	B	AP
50	ARM10	1	S	AP	ARM10-2	1	S	AP
		2	S	AP		2	S	AP

Aynı zamanda antikorların kanserli hücre örneklerinde ve sağlıklı hücre örneklerinde verdikleri bant paternlerinin aynı veya farklı olmasına göre; “aynı patern” ve “farklı patern” olmak üzere iki farklı grupta değerlendirildi (Resim 4). Kontrol edilen 200 splise varyant antikorundan 185’i (bağlanma göstermeyenler dahil) hem akciğer hem de pankreatik kanser örneklerinde aynı paterni gösterirken, 15 antikor normal örneklere kıyasla farklı bant paternleri verdi. Bu örneklerin ekspresyon seviyelerinin de farklılık gösterdiği gözlemlendi (Tablo 16).



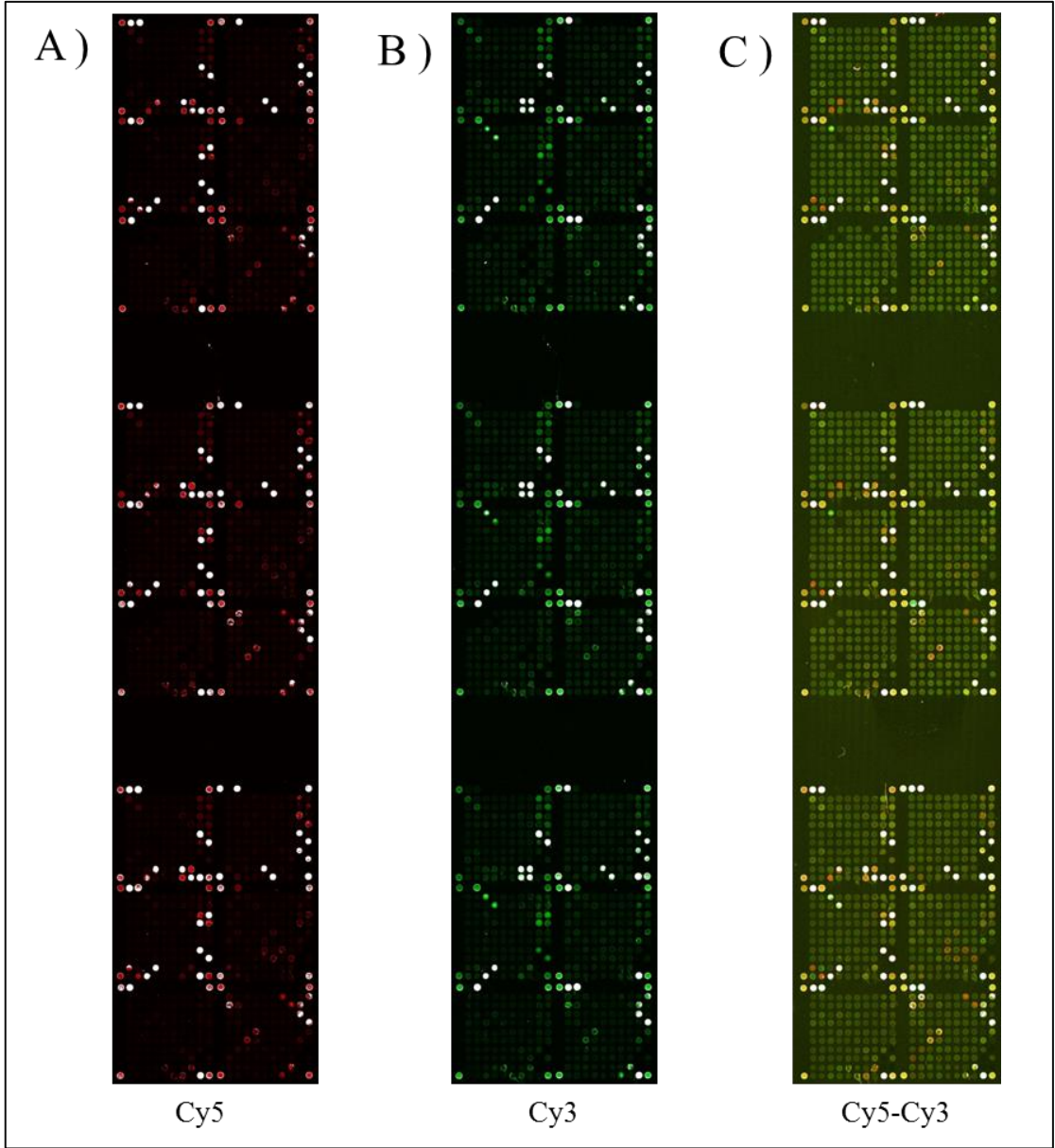
Resim 4. Normal ve kanser örneklerinin bant paternlerinin karşılaştırılması, a) Kanserli örneklerde ve normal örneklerde aynı bant paterni gösteren 116 kDa ağırlığındaki VINC proteini, b) Kanserli örneklerde ve normal örneklerde farklı bant paterni gösteren 48 kDa ağırlığındaki CCKBR proteini, NKD; Normal Karaciğer Dokusu, KKD; Karaciğer Kanseri Dokusu, NHH; Normal Hücre Hattı, KHH; Kanser Hücre Hattı

6.2. Kalite Kontrol Amaçlı Antikor Mikroarray Çiplerinin Üretilmesi

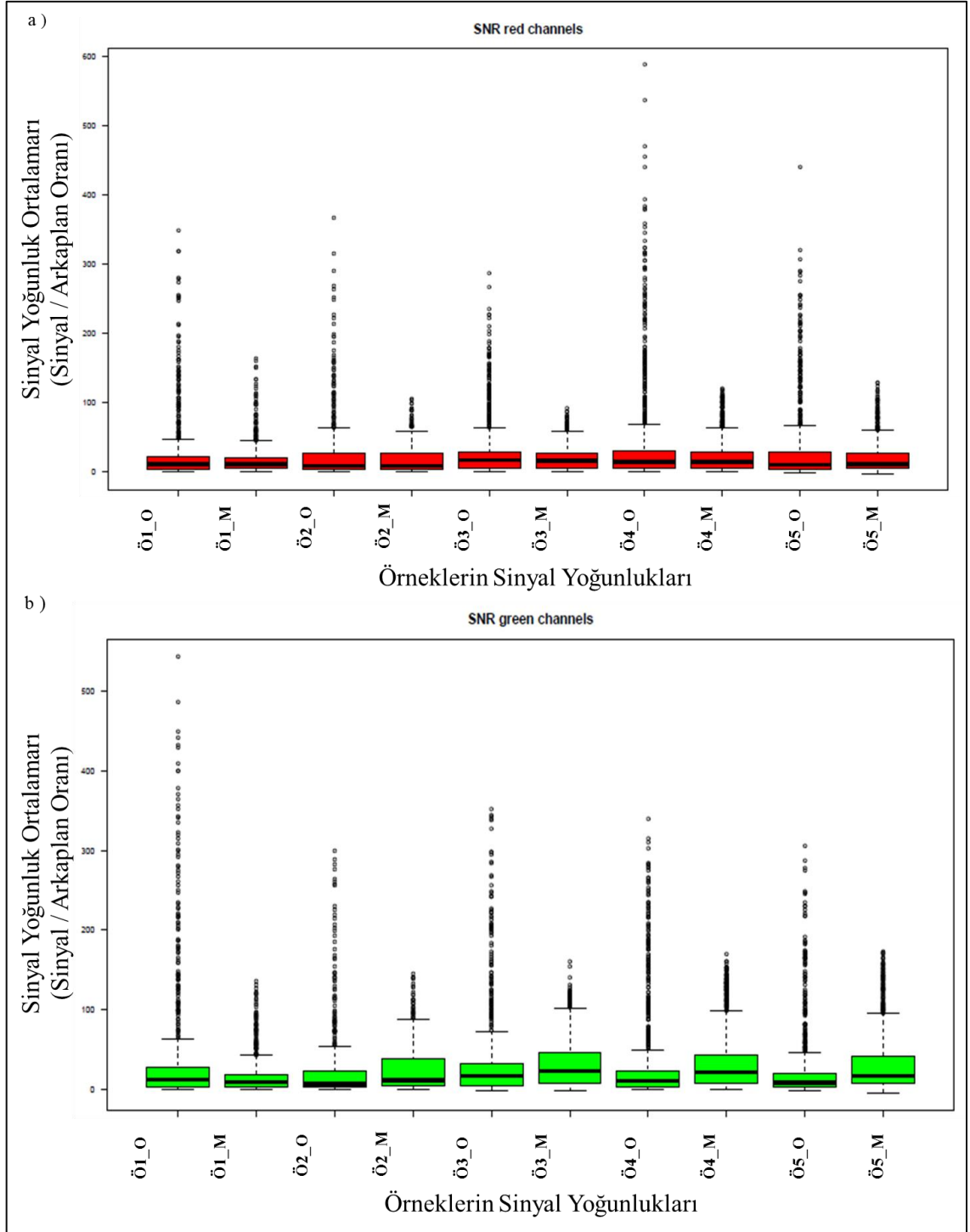
İlk aşamada kalite kontrol testleri için 10 adet çip üretildi. Her bir çip üzerinde 276 antikor, farklı bölgelerde olmak üzere altı kere spotlandı. Böylece, bloklama, hibidizasyon, yıkama, kurutma, tarama aşamalarında oluşabilecek teknik aksaklıklar en aza indirgenme yoluna gidildi. Çiplerin yönlerini, her bir spot grubunun çip üzerindeki yerleşimini, her bir spotun pozisyonunu belirleme ve deneyin çalışıp çalışmadığını kontrol etmemize yarayacak floresan işaretli sekonder antikorlar kullanılarak yön ve kalite kontrol spotları oluşturuldu. Ayrıca her bir çip üzerinde 36 bölgeye kolera enterotoksin’inin B alt birimine özgü üretilmiş olan antikor negatif kontrol amaçlı olarak spotlandı. Bunun yanında her bir çip üzerinde diğer bir negatif kontrol olarak, 36 spot boş bırakıldı (Bkz Resim 1).

6.3. Üretilen Çiplerin Kalite Kontrolü

Üretilen çipler arasından seçilen 5 çip kullanılarak kalite kontrolü testleri yapıldı. Bu amaçla pankreas ve lenfoma çalışma gruplarından oluşturulan alt tür havuzları doğrudan karşılaştırma yöntemiyle çiplere tatbik edilerek hibridizasyon gerçekleştirildi. Hibridizasyon gerçekleştirilen çipler TECAN Power Scanner ile taranarak 645 nm ve 532 nm dalga boylarındaki ışımaların fotoğrafları oluşturuldu (Resim 3). Fotoğraflama sonrasında her iki dalga boyunda oluşturulan fotoğraflar Genepix Pro programı ile birleştirilerek spotların tanımlanması yapıldı (Resim 5). Bu aşamadan sonra spot kalitesi için SNR grafikleri ile oluşturuldu (Şekil 13).



Resim 5. Kalite kontrol çiplerinin fotoğraflanması, a) Cy5 ile işaretlenmiş örneklerin 645 nm dalga boyundaki ışımlarının fotoğrafı, b) Cy3 ile işaretlenmiş örneklerin 532 nm dalga boylarındaki ışımların fotoğrafı



Şekil 13. Kontrol grubu SNR grafikleri, a) (Cy5) 645 nm’de çekilen fotoğrafların ortalama sinyal yoğunluğu, b) (Cy3) 532 nm’de çekilen fotoğrafların ortalama yoğunluğu, ö; Örnek, o; Otomatik, m; Manuel

Örneklerin sinyal yoğunluk ortalamalarının aynı ve sinyal kalitelerinin yüksek olduğu, SNR grafikleri ile gösterilerek çiplerin üretiminde hedeflenen kalite sağlandı.

Bu aşamadan sonra çalışmada kullanılmak üzere aynı protokoller kullanılarak 200 adet çip üretildi.

6.4. Ekspresyon taraması

Seçilen proteinlerin ekspresyon seviyelerinin taraması, çalışma gruplarından oluşturulan havuzların birbirleri ile karşılaştırılması esasına dayalı “ön tarama” ve bireylerin referans ile karşılaştırılması esasına dayalı “markır taraması” olmak üzere iki farklı aşamada gerçekleştirildi.

6.4.1. Pankreas Grubu ile Yapılan Ön Tarama

Bu kapsamda, pankreatik kanser hastalarından alınan örneklerden oluşturulan havuz ve kronik pankreatitis hastalarından alınan örneklerden oluşturulan havuz, sağlık bireylere ait örneklerden oluşturulan havuz ile karşılaştırıldı.

Pankreatik kanser hastalarından oluşturulan havuz ile normal örneklerden oluşturulan havuz karşılaştırıldığında biri slising grubu’ndan 20’si karsinogenezis ilişkili grup’tan olmak üzere 21 proteinin ekspresyonunun pankreas kanserli bireylere ait serum örneklerinde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 17). Değerlendirilen proteinler arasından ekspresyonu azalan bir proteine rastlanmadı. Kronik pankreatitis ile sağlıklı bireylerden oluşturulan havuzun karşılaştırılması sonucunda ise biri slising grubu’ndan biri de karsinogenesi ilişkili grup’tan olmak üzere iki farklı proteinin ekspresyonunun pankreatitis hastalarında azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 18).

Tablo 17. Pankreas kanseri örneklerinde ekspresyon değişimleri, logFc > 0: Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	CCND1	0.0072	0.2368
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	2	MAPK01	0.0007	0.3671
	3	SMAD3	0.0086	0.2945
	4	MAPK11	0.0093	0.4459
	5	SMAD2	0.0128	0.6898
	6	SMAD2	0.0002	0.5873
	7	SMAD2	0.0002	0.7908
	8	SMAD2	0.0026	0.4513
	9	MAPK09	0.0179	0.4414
	10	MKK4	0.0261	0.3523
	11	MKK4	0.0072	0.3639
	12	MKK4	0.0111	0.6661
	13	KC1A	0.0093	0.7212
	14	SMAD4	0.0141	0.4685
	15	SMAD7	0.0004	0.3300
	16	MAPK14	0.0002	0.7170
	17	OTUB2	0.0086	0.5924
	18	RAC1	0.0003	0.7546
	19	RAC1	0.0453	0.6157
	20	MAPK09	0.0001	0.8060
	21	SMAD2	0.0374	0.5168

Tablo 18. Kronik pankreatitis hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri, logFc <0; Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	CCKBR	0.0003	-0.6350
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	2	SMAD2	0.0227	-0.6358

6.4.2. Lenfoma Grubu ile Yapılan Ön Tarama

Bu kapsamda difüz büyük B hücre lenfoma (DLBCL) hastalarından alınan örneklerden oluşturulan havuz, foliküler lenfoma (FL) hastalarından alınan örneklerden oluşturulan havuz ve kronik lenfoid lösemi hastalarından alınan örneklerden oluşturulan havuz, sağlık bireylerden alınan örneklerinden oluşturulan havuz ile karşılaştırıldı.

Difüz büyük B hücre lenfoma hastalarından oluşturulan havuz ile normal örneklerden oluşturulan havuz karşılaştırıldığında 11 farklı proteinin ekspresyonunun DLBCL hasta serum örneklerinde anlamlı olarak değiştiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Bu

proteinlerin 10'unun ekspresyonunda artış gözlenirken, 1'inin ekspresyonunda azalma gözlemlendi (Tablo 19). Foliküler lenfoma (FL) hastalarından oluşturulan havuz ile normal örneklerden oluşturulan havuz karşılaştırıldığında; 88 proteinin ekspresyonunun FL hastalarının serum örneklerinde anlamlı olarak değiştiği gözlemlendi ($p<0.05$). Bu proteinlerin 37'sinin ekspresyonunda artış gözlenirken, 51'inin ekspresyonunda azalma gözlemlendi (Tablo 20). Kronik lenfositik lösemi (CLL) hastalarından oluşturulan havuz ile normal örneklerden oluşturulan havuz karşılaştırıldığında ise 16 proteinin ekspresyonunda artış ve 17 proteinin ekspresyonunda azalma olmak üzere toplam 33 proteinin ekspresyonlarında anlamlı seviyede ($p<0.05$) değişiklik gözlemlendi (Tablo 21).

Tablo 19. DLBCL hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri, $\log Fc<0$; Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir, $\log Fc>0$; Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	PTN13	0.0006	-0.3491
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	2	MAPK01	0.0017	0.3542
	3	MAPK11	0.0239	0.2864
	4	MAPK11	0.0229	0.2848
	5	MAPK13	0.0129	0.2960
	6	MKK4	0.0436	0.2876
	7	BMX	0.0006	0.5401
	8	BMX	0.0229	0.2640
	9	SMAD4	0.0257	0.2395
	10	SMAD2	0.0239	0.2691
	11	MKK6	0.0292	0.2130

Tablo 20. FL hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri, logFc <0; Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir. LogFc >0; Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	RAC3	0.0005	0.6472
	2	RAC3	0.0432	0.5408
	3	TFPI2	6,18E+09	1,75E+14
	4	TFPI2	1,85E+09	1,27E+14
	5	A4ZVU7	1,70E+00	1,10E+14
	6	GASR	2,28E+05	0.8302
	7	GASR	1,02E+07	3,41E+14
	8	GASR	0.01525	0.4315
	9	MDM2	0.01248	0.6110
	10	MDM2	7,07E-03	1,38E+14
	11	MDM2	1,84E+06	0.6291
	12	MDM4	3,65E+07	1,05E+14
	13	MDM4	8,93E+07	0.4895
	14	CRK	0.0300	0.4784
	15	CP1A1	4,23E+08	0.8909
	16	CP1A1	0.0005	0.3368
	17	CP1A1	0.0124	-0.6998
	18	NTRK1	1,91E+06	0.6854
	19	PCBP4	0.0048	0.2989
	20	KSYK	8,74E+08	0.6296
	21	BIRC5	8,77E-02	1,07E+14
	22	BIRC5	9,95E+03	1,01E+14
	23	CXCR3	2,48E+08	0.6003
	24	RUNX1	2,95E+05	1,06E+14
	25	FGFR3	0.0023	0.3329
	26	FGFR3	0.0029	0.3094
	27	FGFR3	7,71E+05	0.8489
	28	CCND1	0.0082	0.3014
	29	CCND1	2,95E+05	0.7251
	30	TERT	0.0209	0.4870
	31	P73	0.0031	0.2561
	32	P73	0.0041	0.3232
	33	FGFR2	0.0064	0.4305
	34	ACTN1	0.0010	0.5565
	35	VLDLR	0.0385	-0.4447
	36	HMMR	4,27E+09	0.8453
	37	SCF	0.0239	0.2026
	38	IRF1	0.0220	-0.2312

Tablo 20. FL hasta örneklerinde ekspresyon değişimleri (Devam)

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	39	SMAD3	3,72E+09	-0.8023
	40	MAPK11	3,04E+04	-0.8915
	41	MAPK12	1,91E+09	-0.5076
	42	MAPK13	8,88E+02	-0.9669
	43	SMAD2	2,37E-02	-1,0E+14
	44	SMAD2	0.0005	-1,6E+14
	45	SMAD2	2,53E+04	-1,1E+14
	46	SMAD2	6,55E-06	-1,6E+14
	47	KAP2	0.0001	-0.5748
	48	KAP3	4,13E+04	-1,2E+14
	49	KAP3	0.0026	-0.3083
	50	MAPK09	1,27E+03	-1,1E+14
	51	MAPK09	2,74E+09	-0.752
	52	MKK4	7,28E+06	-0.8242
	53	MKK4	0.03581	-0.2641
	54	MKK4	0.0457	-0.4283
	55	BMX	3,54E+00	-1,0E+14
	56	BMX	4,29E+09	-2,6E+14
	57	BMX	0.0003	-0.423
	58	SHC4	1,70E+00	-1,3E+14
	59	SH21A	5,07E+05	-0.6019
	60	IL6	0.0029	-0.476
	61	MAPK08	0.00827	-0.6248
	62	MAPK08	0.0006	-0.8745
	63	SMAD2	0.0010	-0.5797
	64	SMAD4	1,60E-11	-4,0E+14
	65	SMAD4	9,54E-03	-1,1E+14
	66	SMAD4	2,16E+04	-1,0E+14
	67	SMAD3	1,44E+03	-1,0E+14
	68	MAPK09	9,00E+04	-0.6096
	69	KAP2	0.0006	-0.7086
	70	MAPK14	0.0002	-0.765
	71	OTUB2	3,04E+04	-1,2E+14
	72	GAK	3,13E+07	-0.9062
	73	RAC1	0.04761	-0.6073
	74	MAPK09	1,61E+07	-3,7E+14
	75	SMAD2	0.02909	-0.2887
	76	SMAD2	5,70E+00	-1,2E+14
	77	SMAD2	0.03709	-0.4078
	78	SMAD2	2,14E+07	-0.7550
	79	SMAD2	1,40E+04	1,1E+14
	80	SMAD2	1,07E+06	-0.9516
	81	MAPK09	9,88E-01	-1,5E+13
	82	SMAD2	7,62E+05	0.8657
	83	TNR5	5,20E+05	-0.6574
	84	ASGR1	2,00E+08	-0.6780
	85	SMAD2	3,13E+07	-0.8268
	86	ASGR1	0.00112	-3,3E+14
	87	MKK6	2,94E+01	-0.8316
	88	AW.SRM	1,00E+06	-2,0E+14

Tablo 21. CLL hasta örneklerinde ekspresyonu değişen proteinler, logFc <0: Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir. LogFc >0: Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	TFPI2	4,1E+06	-1,3E+13
	2	GASR	0.01329	-1,3E+13
	3	MDM2	0.019462	0.2543
	4	MDM4	0.00025	0.5899
	5	LRRF2	0.0253	-0.15999
	6	PCBP4	0.00434	0.247915
	7	BIRC5	0.0311	0.197912
	8	RIPK3	0.017354	-0.18535
	9	P73	0.04546	-0.16555
	10	FGFR2	0.04286	-0.1811
	11	CALD1	0.00795	-0.3567
	12	CALD1	0.00349	-0.6424
	13	ACTN1	0.01735	-0.33965
	14	MCL1	0.000265	-0.51412
	15	ADA15	0.042863	0.1870
	16	SCF	0.03110	0.15833
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	17	SMAD2	4,86E+07	0.4873
	18	SMAD2	0.01735	0.1963
	19	SMAD2	0.0267	0.3283
	20	SMAD2	0.00037	0.3736
	21	MAPK09	0.04286	0.2724
	22	BMX	0.00011	-0.5700
	23	BMX	0.01663	0.2404
	24	SHC4	0.00603	0.3424
	25	SMAD7	0.04127	-0.206
	26	TGFR2	6,71E+04	-1,4E+14
	27	SMAD2	0.01495	0.2788
	28	SMAD2	0.0173	-0.3215
	29	SMAD2	0.00073	0.42628
	30	MAPK09	0.00037	0.5158
	31	SMAD2	0.04807	-0.269
	32	IGF1	0.014957	-1,0E+14
	33	MMP7	0.00026	-1,0E+14

6.5. Markır taraması

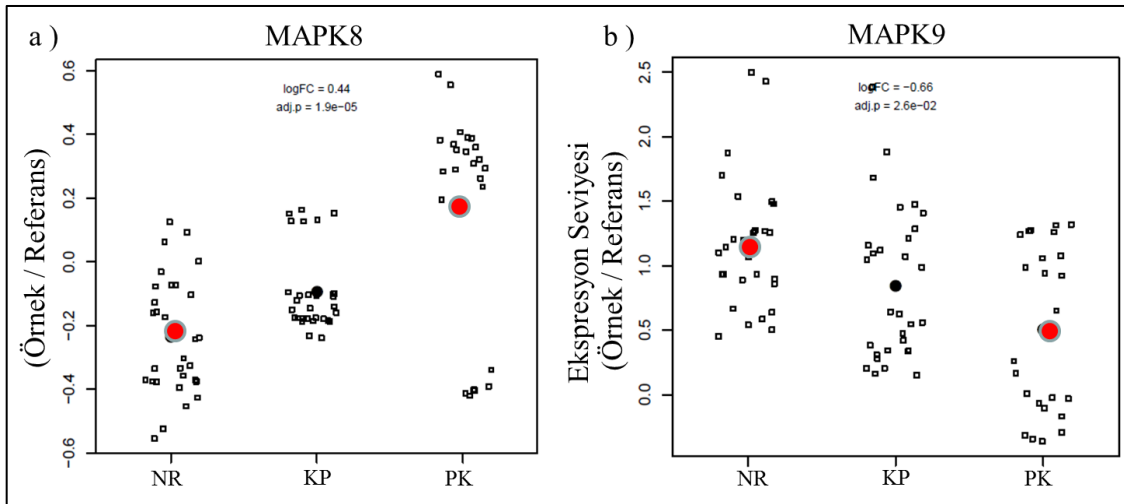
Bu aşamada, proteinlerin her bir hasta örneğindeki ekspresyon seviyesi, ilgili grupların orantılı olarak karıştırılması ile oluşturulan referans ile karşılaştırıldı.

Pankreas kanseri grubu ile yapılan taramada, her bir grup içindeki her bir birey, bu grup için hazırlanan referans ile tek tek karşılaştırıldı. Gruplar içindeki beş bireye ait ekspresyon verileri bir araya getirilerek her bir proteinin ortalama ekspresyon değeri belirlendi.

Pankreas kanseri için yapılan aynı işlem lenfoma grubu içinde tekrarlandı. Gruplar içindeki 17 bireye ait ekspresyon verilerinin ortalaması alınarak her bir proteinin ekspresyon seviyesi belirlendi.

6.5.1. Pankreas Grubu ile Yapılan Markır Taraması

Pankreas kanserli hastalardan oluşan grupta iki proteinin (MAPK8 ve MAPK9) ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Her ikisi de *karsinogenezis ilişkili grup* içinde yer alan bu proteinlerden, MAPK8'in ekspresyonu artarken, MAPK9'un ekspresyonunda azalma görüldü. Her iki proteinin ekspresyon seviyeleri, toplam 30 spotta okunan ekspresyonların ortalaması alınarak oluşturuldu (Şekil 14) (Tablo 22).

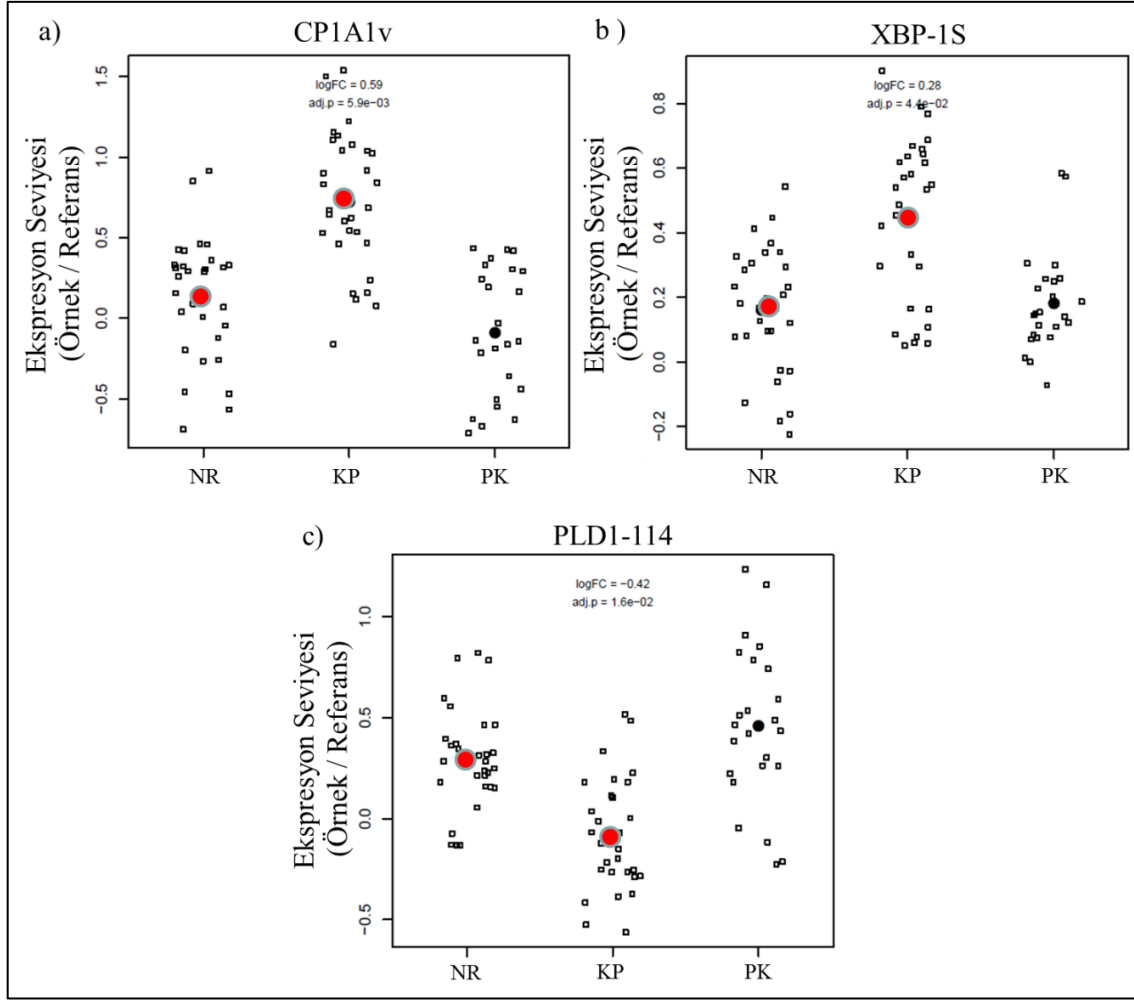


Şekil 14. Pankreas kanseri hastalarında bulunan markır proteinler. A) MAPK8 proteininin ortalama ekspresyon seviyesinin pankreatik kanserli hastalara ait serum örneklerinde artması. B) MAPK9 proteininin ortalama ekspresyon seviyesinin pankreatik kanserli hastaların serum örneklerinde azalması. NR; Sağlıklı bireylere ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri. PK; Pankreas kanserli bireylere ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri. KP: Kronik pankreatitis hastalarına ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri ($P>0,05$;Anlamli değil) Kırmızı nokta: Proteinin grup içinde hesaplanan ortalama ekspresyonu.

Tablo 22. PK’da MAPK8 ve MAPK9 proteinlerinin ekspresyonları, $\log Fc < 0$; Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir. $\log Fc > 0$; Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Karsinogenesis ile ilişkisi bilinen proteinler grubu (ScFv Antikorları)	1	MAPK8	0,0001	0,443
	2	MAPK9	0,0256	-0,664

Kronik pankreatitis grubunda ise üç proteinin (CYP1A1v, PLD1-114, XBP-1S) ekspresyonunda değişim gözlemlendi (Şekil 15). *Splise varyant grubu*’nda bulunan bu proteinlerden CYP1A1v ve XBP-1S’in ekspresyonu artarken PLD1-114’nin ekspresyonunda azalma görüldü (Tablo 23).



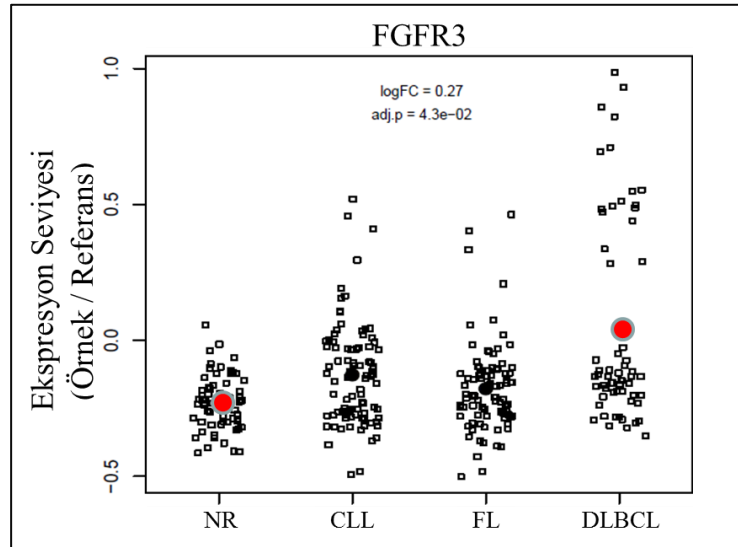
Şekil 15. Kronik pankreatitis hastalarında bulunan markır proteinler, a) CP1A1v proteinin ortalama ekspresyon seviyesinin kronik pankreatitis hastalarına ait serum örneklerinde artması. b) XBP-1S proteinin ortalama ekspresyon seviyesinin kronik pankreatitis hastalarına ait serum örneklerinde artması c).PLD1-114 proteinin ortalama ekspresyon seviyesinin kronik pankreatitis hastalarına ait serum örneklerinde azalması NR: Sağlıklı bireylere ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri, KP: Kronik pankreatitis hastalarına ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri. PK; Pankreas kanserli bireylere ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri ($P > 0,05$; Anlamlı değil). Kırmızı nokta; proteinin grup içinde hesaplanan ortalama ekspresyonu.

Tablo 23. KP’de CP1A1v, PLD1v ve XBP1 proteinlerinin ekspresyonları, logFc <0: Proteinin ekspresyonun azaldığını ifade etmektedir. LogFc >0: Proteinin ekspresyonun arttığını ifade etmektedir.

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	CP1A1v	0,005	0,591
	2	PLD1-114	0,015	-0,418
	3	XBP-1S	0,044	0,281

6.5.2. Lenfoma Grubu ile Yapılan Markır Taraması

Foliküler lenfoma (FL), kronik lenfosittik lösemi (CLL) ve difüz büyük B hücre Lenfoması (DLBCL) alt gruplarından oluşan lenfoma hastalarında yapılan markır taraması sonucunda sadece DLBCL grubunda olmak üzere FGFR3’ün ekspresyonunda artış gözlemlendi. FGFR3’ün her bir grup için ortalama ekspresyonu, grup içindeki bütün bireylerin ortalaması hesaplanarak belirlendi (Şekil 16) (Tablo 24).



Şekil 16. DLBCL’de FGFR3 proteininin ekspresyon seviyesi. NR: Sağlıklı bireylere ait serum örneklerdeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri, DLBCL: Difüz büyük B hücre lenfoması hastalarına ait serum örneklerindeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri. FL: Foliküler lenfoma hastalarına ait serum örneklerindeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri ($P>0,05$;Anlamli değil). CLL: Kronik lenfomositik lösemi hastalarına ait serum örneklerindeki ilgili proteinin ekspresyon seviyeleri ($P>0,05$;Anlamli değil). Kırmızı nokta; proteinin grup içinde hesaplanan ortalama ekspresyonu.

Tablo 24. DLBCL’de FGFR3 proteininin ekspresyonu

Grup	No	Protein	P-Value	LogFc
Splise varyantları karsinogenesis ile ilişkilendirilmiş proteinler grubu (Splise varyant antikorları)	1	FGFR3	0,0433	0,2720

Çalışmaya dahil edilen lenfomanın diğer iki alt türü olan foliküler lenfoma ve kronik lenfosittik lösemi hastalarına ait serum örneklerinde herhangi bir proteinin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çağımızın en ölümcül ve en yaygın hastalıklarının başında gelen kanser insanların yaşam kalitesini düşürürken hem bireylere hem de ülkelere ağır ekonomik yük getirmektedir. Bu durum kanseri en popüler çalışma alanlarından bir yapmaktadır. Amerika’da sadece kanser üzerine araştırma yapan 27 enstitü bulunmakta ve bunlardan biri olan Ulusal Kanser Araştırma Enstitüsü, kanser araştırmaları için yıllık ortalama 5 milyar dolar harcama yapmaktadır (86). Kanser araştırmalarında karşılaşılan en büyük sorun ise hastalığın yüksek derecede heterojen olmasıdır.

Pankreatik kanser (PDAK) en ölümcül kanser türlerinden biri olup, erken tanı yaşam süresini uzatmaktadır. Fakat tedavinin başarıya ulaşması için gerekli olan erken tanı, hastaların ancak %20’sinde mümkün olabilmektedir. Diğer yandan lenfositlerde meydana gelen ve malignant bir tümör olan lenfoma, yüksek derecede heterojenite göstermektedir. Bu yüksek heterojenite, hastalığın tanı ve tedavisini zorlaştıran en büyük etkenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (3, 4, 12-14, 54). Gerek kanserlerin yüksek çeşitliliği, her bir kanser türünün kendi içerisindeki yüksek heterojenitesi ve erken tanının hayati önem taşıması erken tanıda kullanılabilecek biyomarkırların gerekliliğini ön plana çıkartmaktadır.

Her iki kanser türünde keşfedilen biyomarkırlar, bu hastalıkların tanı ve tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir. Kolorektal kanserin tanısında kullanılan ve 1981 yılında keşfedilen *Karbohidrat Antijeni 19-9* (CA19-9), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve pankreatik kanser tedavisinin takibi için de kullanılmaktadır. Fakat duyarlılığı ve özgünlüğünün düşük olması nedeniyle istenilen seviyede sonuçlar vermemektedir (87, 88). *Chen ve arkadaşları*, 2013 yılı itibarı ile, primer gastrointestinal difüz büyük B hücre lenfoması (PGI-DLBCL) hastalarında, iğ iplikleri kontrol noktası proteini olan BubR1’nin ekspresyonunun aşırı seviyede arttığını göstermişlerdir (10). Hücre proliferasyonunda artışa neden olan bu protein, PGI-DLBCL için potansiyel bir biyomarkır olarak görülmektedir (89).

Öte yandan, proteomik farklılaşmanın en önemli mekanizmalarından biri olan alternatif splising, çeşitli splise varyantlarının oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca genomdaki bir mutasyonun neden olduğu hastalıkların çoğu splising mutasyonları ile meydana gelmektedir (70). Birçok patolojik durumda, hnRNA’lar anormal şekilde

splisinge uğramakta ve beklenenin dışında pre-mRNA'lar oluşmaktadır. Bu anormal pre-mRNA'lar kanser oluşumunu ve gelişimini tetikleyebilecek anormal proteinleri kodlayabilmektedir (24). Bununla birlikte, protoonkogenlerde ve tümör süpressör genlerde meydana gelen splising mutasyonları karsinogeneze avantaj sağlayan yeni varyantlar oluşturabilmektedir. Bu varyantların tanımlanması hem kanser gelişiminin anlaşılması hem de markır olabilecek proteinlerin bulunması açısından son derece önemlidir (7, 23, 24, 70, 90).

Kanserlerin erken tanısında kullanılabilecek yeni biyomarkırların belirlenmesine yönelik araştırmalarda genel olarak iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Birincisi, kanserle ilişkili yollarda görev aldığı düşünülen proteinlerin western blot ve RT-PCR gibi yöntemler kullanılarak varyasyonlarının ve ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin tek tek incelenmesi prensibine dayanır. İkinci yaklaşım ise istatistik ve matematiksel hesaplamalarla kombine edilen ve aynı anda çok sayıda protein veya genin değerlendirilebildiği mikroarray veya kütle spektrofotometri (MS) gibi yöntemlerdir. Tek bir markırdan elde edilebilecek veriler bir kanserin erken tanısı için yeterli görülmemektedir. Bu durum her bir kanser için olabildiğince fazla markırın gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bununla paralel olarak, günümüzde aynı anda çok sayıda proteini değerlendirme imkanı sağlayan array ve kütle spektrofotometrisi gibi yöntemler daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemlerin tercih edilmesindeki diğer bir etken ise özgünlük ve duyarlılıklarının yüksek olmasıdır (71).

Antikor mikroarray yöntemi aynı anda çok sayıda proteini test edebilmesi, duyarlılığının ve özgünlüğünün yüksek olması nedeniyle kanserlerde yeni biyomarkırların araştırılmasına yönelik çalışmalarında ideal bir yöntem olarak günümüzde yerini almıştır (18, 21, 53, 84, 91). Ancak, bu yöntem ile bir proteinin yeni splise varyantlarının olup olmadığını belirlemek mümkün olmamaktadır. Western blot yöntemi ise aynı anda az sayıda proteini çalışma kısıtlılığına sahip olmasına rağmen bir proteinin splise varyantlarını belirleme potansiyeline sahiptir. Özet olarak, Western blot yöntemi ile antikor mikroarray yöntemi biyomarkır olabilecek proteinlerin belirlenmesine yönelik çalışmalarında birbirini tamamlayan yöntemler olarak görülmektedir (92-95).

Kanser biyomarkırı araştırma çalışmalarında splise varyantları her zaman dikkate alınan bir konu olmuştur ve çeşitli kanser dokularından ve kanser hücre hatlarında kanserle ilişkili genlerin splise varyantları araştırılmıştır (96-105). Bu tarz çalışmalarda, splise varyantları mRNA üzerinden gidilerek RT-PCR, oligonükleotid array ve yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Splise varyantlarının protein seviyesinde değerlendirilmesine yönelik çalışmalarında ise Western blot ve MS yöntemleri kullanılmıştır (96-105). RT-PCR, oligonükleotit mikroarray ve yeni nesil dizileme gibi yöntemler bir genin ancak transkriptleri hakkında bilgi verirken, kodladığı proteinlerin seviyesi ve varyasyonları hakkında yeterli bilgi vermemektedirler. Antikor mikroarray yöntemi ise protein seviyesindeki değişimler hakkında bilgi vermesi açısından, biyomarkır çalışmalarında son derece önemlidir (106). Bugüne kadar proteinlerin splise varyantları Westen blot yöntemi ile taranmıştır. Western blot yöntemi mikromolar (10^{-6} Molar) seviyesinde proteinleri test edebilirken antikor mikroarray yöntemi pikomolar (10^{-12} Molar)-zemtomolar (10^{-15} Molar) seviyesindeki proteinleri test edebilmektedir (85). Western blot yöntemine karşı mikroarray yönteminin bu hassasiyeti, hücre içi proteinlerin serumdaki seviyelerinin araştırılmasında tarafımızdan önemli bir avantaj olarak görülmüştür. Diğer taraftan, serumda bulunan proteinlerin yüksek bir miktarını albüminin oluşturması, serumun Western blot çalışmalarında kullanılmasını engellemektedir (78). Bu durum antikor mikroarray çalışması için ise bir sorun teşkil etmemektedir. Bu noktadan hareketle; bizim çalışmamızda bir ilke imza atılarak, biyomarkır olma potansiyeline sahip proteinlerin splise varyantları antikor mikroarray yöntemi ile insan serum örneklerinde incelenmiştir. Bu durum, gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmanın, daha önce yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında göze çarpan en önemli yönlerinden birini oluşturmaktadır.

Az sayıda örnekle çalışılması dez avantajı olmasına rağmen Western blot tekniği antikor validasyonu için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (78). Bu noktadan hareketle özel olarak ürettirdiğimiz splise varyant antikorlarının çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla western blot yöntemi kullanılmıştır. Farklı bant paterni görülen proteinler yeni splising varyantı araştırmaları açısından potansiyel kaynak olarak düşünülmüştür. Bu proteinlere özgü antikorlar kullanılarak yapılacak immünpresipitasyon ve sıvı kromotografi-kütle spektrofotometri (LC-MS) yöntemleri ile ilgili kanser türlerinde

yeni biyomarkırların keşfedilme olasılığı yüksektir (100). Western blot ile test aşamasından sonra çalışmanın temelini oluşturan mikroyarray aşamasına geçilmiştir.

Pankreas kanseri en ölümcül kanserlerden biri olup beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %5'tir. Hastalığın en sık görülen formu olan pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK), pankreasın ekzokrin kısmından gelişen tümörlerle oluşmaktadır. Bu tümörler çok hızlı biçimde büyümekte ve karaciğer, lenf gibi diğer dokulara metastaz yapmaktadır. Hastalığın erken aşamada saptanamamasının nedenlerinin başında erken metastaz, anatomik lokalizasyon ve agresif invazyon gelmektedir. Tedavisi için erken tanı sağlayabilecek biyomarkırlar ve hastalığın gelişiminin anlaşılması gerekmektedir (3, 4, 9, 107).

Çalışmamızda ilk olarak pankreas kanserli hasta serumları normal örnekler ile karşılaştırıldı. C-jun N-terminal protein kinaz 1 (JNK1) proteinin ekspresyonunda artış görülürken, C-jun N-terminal protein kinaz 2 (JNK2) ekspresyonunda azalma görüldü. JNK1 (MAPK8) ve JNK2 (MAPK9); hücre proliferasyonu, apoptozis, DNA tamiri ve metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Artmış JNK1 ekspresyonu, hücre proliferasyonunda artışın göstergesi olabilmektedir (108, 109). Ayrıca hepatoselüler karsinoma hücrelerinde JNK1'in ekspresyonunun düşmesi migrasyon ve invazyonun azalmasına neden olduğu bulunmuştur (110). Bu yönü ile bakıldığında JNK1 pankreas kanserlerinde hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyon aşamalarında görev yapan bir biyomarkır olma yolunda aday olarak görülmektedir. Zhang ve arkadaşları, pankreatik kanser hücrelerinde arttığı gözlenen timozin beta 4 adlı hormonun JNK sinyal yolağını aktive ederek, kanserin ilerlemesine neden olduğunu göstermiştir (111). Bir diğer çalışmada ise timozin alfa'nın ekspresyonu yine JNK'nın fosforilasyonunu artırarak hücre proliferasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (112). Bu durum, JNK'ların biyomarkır olarak değerlendirilebileceğini gösterirken timozon beta 4 ve timozin alfa'yı da biyomarkır olarak değerlendirme sürecinde ön plana çıkartmaktadır. JNK'lar hücre içi moleküllerdir. Bunun yanında timozin gibi hormonlar ekstrasellular sıvılarda bulunarak etki etmektedirler. Dolayısıyla bu proteinlerin serumdaki seviyelerinin daha erken evrede değişmesi beklenen bir durumdur.

JNK1 hücre proliferasyonunda pozitif bir etkisi varken JNK2 ise hücre proliferasyonunu negatif bir şekilde etkilemektedir (113). *JNK2^{-/-}* fibroblastlarda ve

eritrositlerde yapılan çalışmada, hücrelerin G1 fazından S fazına girişleri normale (yabanıl tip) göre daha hızlı olduğu ve proliferasyonun arttığı gözlemlenmiştir (114). Buna bağlı olarak hücrelerde JNK2'nin bulunmaması, hücrenin S fazına girişinin hızlı olması genomik kararsızlığı artırıp karsinogenez için avantaj sağladığı düşünülmektedir. Hepatoselüler hücrelerde JNK1 ve JNK2'nin ekspresyonunun düşük olması bu kanserin yıkıcı etkilerini artırdığı ve tümör gelişimi sağladığı bilinmektedir (115). JNK'ların farklı kanser türlerinde pleotropik (çift yönlü) etki göstermeleri upstream moleküllere bağlı olduğu düşünülmektedir. Fakat bu moleküller, hala bilinmezliğini korumaktadırlar (113, 116). Bu bağlamda JNK2'nin regülasyonunu düzenleyen moleküllerin araştırılması bu yolağın pankreas kanseri gelişimindeki etkisinin aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır.

JNK1 ve JNK2 proteinlerinin pankreas kanseri serumlarındaki ekspresyonun değiştiği, ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Artmış JNK1 ve düşük JNK2 ekspresyonu, pankreas kanserinin hücre proliferasyonunun arttığını gösteren bir potansiyel markır olarak kullanılabilir.

Kronik pankreatitis, pankreasta meydana gelen, ağır ve uzun süre seyreden bir inflamasyon durumudur. Hastalık iyileşmez ve zamanla kötüleşir, tedavi edilmezse pankreasta kalıcı hasarlara neden olur. Kronik pankreatitisin en kötü sonuçları ise diyabet ve pankreatik kanserdir. Hastada kronik inflamasyon durumu genellikle, gatekeeper ya da caretaker genlerinde değil landscaper genlerinde bozukluğa yol açmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar anormal stromal çevre oluşturarak neoplastik transformasyonu tetiklemektedir. Ayrıca kronik pankreatitis ile ilgili birçok faktör pankreatik hücrelerin malignant transformasyonu için gerekli olan genomik hasarı ve hücresel proliferasyonu artırdığı gözlenmiştir (31, 45, 46, 48).

Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) biyotransformasyonda görev alan bir enzimdir. CYP1A1 endojen ve eksojen substratları daha kanserojen hale katalizleyebilmektedir. CYP1A1 ve splice varyantı CYP1A1v'nin over-ekspresyonu neoplastik transformasyonu tetiklemektedir (117). CYP1A1v ilk kez ovaryum kanserinde over-eksprese olduğu bulunmuş ve kanser gelişimde rol aldığı düşünülmektedir (118). CYP1A1v hakkında literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Pankreatitisli hasta serum örneklerinde artmış ekspresyonu, malignant transformasyon ve artmış hücre

proliferasyonu gibi pankreatik kanser gelişiminin tetikçisi olabilecek yolların aktivitesinin göstericisi olabilir ve hastalık kötü sonuçlar doğurmadan tedavinin başlatılmasına yardımcı olarak kullanılabilir.

X box binding protein 1 (XBP1) hepatosit büyümesi, plazma hücresi farklılaşması ve proteinin üç boyutlu yapısının bozuk durumlarda görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür. XBP1'in ekspresyonu meme kanserinde artmış durumdadır. Ayrıca XBP1, östrojenin kontrol ettiği bir gen olmakla birlikte, östrojen reseptör alfa (ER α) ile sıkı bir ilişki içindedir. Bu ilişki meme karsinogenezinde önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir ve ER α meme kanserinde markır olarak kullanılmaktadır (119-122). Fujimoto ve arkadaşları kolon kanseri ve adenokarsinoma hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, XBP1 proteinin ekspresyonunun arttığını ve bunun hücre farklılaşmasının bozulmasına neden olarak, hücreyi kontrolsüz büyümeye sevk ettiğini göstermişlerdir (119). XBP1 proteinin splise varyantı olan XBP1s, endoplazmik stres (ER stres) durumunda oluşmaktadır ve bu olay için markır olarak kabul edilmektedir. ER stresi nörodejeneratif hastalıklara ve diyabete neden olduğu bilinmektedir (123). Diyabet hastası sıçanlarda yapılan çalışma da XBP1S'in hücre dışı matriks (ECM) ve oksidatif strese oluşumunu tetiklemektedir (124). Multiple miyeloma hastalarında XBP1s ekspresyonunun artması hücresel mikro çevre (stroma) oluşumunu artırmaktadır. Hücre dışı matriks gelişimi ile oluşan mikro çevre multiple myelomada hücre büyümesini artırmaktadır (125). ECM ayrıca pankreatik kanser gelişimini (invazyon, metastaz ve kemoterapiye direnç gibi) teşvik eden mikro çevrenin de temel yapı taşlarından birisidir (126, 127).

Bu noktadan yola çıkarak kronik pankreatitis hasta serumlarında gördüğümüz artmış XBP-1S ekspresyonu; hastalığın en kötü sonuçlarından olan, diyabet ve pankreatik kanser gelişimine olanak sağlayabilir (31, 45, 48, 123). XBP1s oluşumunu tetikleyen yolların ya da XBP1s'in kendisini hedef alan çalışmalar kronik pankreatitisin olumsuz sonuçlarını tedavi etmeye ya da önlemeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Fosfolipaz D (PLD), fosfatidilkolinden, fosfatidik asid ve kolin oluşumunu katalizleyen bir enzimdir. İki temel sinyal sistemi bu enzimin kontrolünde görev alır: Birincisi insülin, serum epidermal büyüme faktörü (EGF) ve tirozin kinazlar gibi

büyüme faktörler/mitojenler, ikincisi ise Arf ve Rho gibi küçük GTPaz proteinleri. PLD enzimi, lipid-aracılı sinyal iletimini yolağı, vesiküler trafik, hücre proliferasyonu, tümör oluşumu, diyabet ve hücre iskeletinin organizasyonu gibi olaylarda görev alır (128-131). Enzimin regülasyonunda görev yapan Rho ailesi proteinleri melanomada metastatik potansiyeli artırdığı bilinmektedir. PLD1'in splice varyantları PLD1a ve PLD1b'nin melanomada eksprese oldukları ve birçok çalışmada bu enzimin tümör hücrelerinde (meme, kolon, gastrik, mide ve tiroid) aktif ya da over-eksprese olduğu gösterilmiştir (130, 132). Literatürde PLD1b varyantı ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte, PLD1 enziminin düzenlenmesinin nasıl olduğu gizemini korumaktadır (131). Bosch ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmada, lipaz salgılamada görevli olan pankreatik asinüs hücrelerinin (4) PLD1b varyantını salgıladığını ve bu enzimin regülasyonunun, nörotransmitterler, hormonlar ve kolositokin (CKK) gibi salgılar ya da Arf ve RhoA gibi GTPazlar tarafından düzenlenmediğini göstermişler (133). Sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada; pankreatik β -hücreleri, inflamasyonda görev alan bir sitokin olan IL-1 β ile uzun süre muamele edilmesi durumunda β -hücrelerindeki PLD1a ve PLD1b enzimlerinin oranının normalin altına düştüğü görülmüştür. İnsulin salgılamada da görev yapan bu enzimlerin protein seviyesindeki ekspresyonlarının düşmesi sonucunda, insülin salgılaması azalmış ve pankreatik β -hücrelerinin görev yapamaz hale gelmiştir (134).

Çeşitli kanser türlerinde PLD1 enziminin ve varyantlarının artmış ekspresyonu karsinojenik mekanizmalarla bağdaştırılmaktadır fakat pankreas kanseri ile olan ilişkisi bulunamamıştır. Kronik pankreatitis hastalarının serum örneklerindeki PLD1b ekspresyonunun anlamlı bir biçimde düşmesi, kronik pankreatitisin yıkıcı sonuçlarından olan diyabetin (45) habercisi ve diyabet tanısı için bir biyomarkır adayı olabilir.

Çalışmamızın ikinci kısmını oluşturan lenfoma, lenf sistemi hücrelerinden olan B lenfositleri, T lenfositleri ve NK hücrelerinin kontrolsüz büyümesiyle meydana gelir. Beş yıllık yaşam süresi %70'tir. Tedavinin önündeki en büyük engel hastalığın yüksek derecede heterojen olmasıdır. Temelde iki farklı alt türü bulunan (Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin lenfoma) WHO'nun sınıflandırmasına göre 30'dan fazla alt türe ayrılmaktadır. Alt grupların sınıflandırılmasına yönelik yapılacak çalışmalar ve bulunabilecek biyomarkırlar hastalığın tanı ve tedavisi açısından çok önemlidir (12-14).

Difüz büyük b hücre lenfoması, non-Hodgkin lenfomanın alt türlerinden olan en sık olarak gözlenen formudur. Son yıllarda hastalığın insidansı yaşla beraber artmakta ve bu artışın devam edeceği düşünülmektedir (63, 64). Hastalığın etkin tedavisi için tanı ve alt türlerin sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar çok önemlidir (18).

Çalışmamızda lenfomanın alt türlerine ait serum örnekleri kullanılarak yapılan tarama sonucunda sadece difüz büyük b hücre lenfoması örneklerinde, fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)'ün ekspresyonunda anlamlı bir şekilde artış olduğu bulundu.

Fibroblast büyüme faktörü reseptörlerinden biri olan FGFR3, hücre tipine göre hücre çoğalması, farklılaşması, yaşamını devam ettirmesi ve tümörögenesis gibi farklı görevlerde yer alır (135, 136). FGFR3, hücre büyümesini tetiklemek için iki farklı mekanizma kullanmaktadır. 1) Otoendosis ile mitojenleri kanser hücrelerinin içine alırlar. 2) Anjiyogenezi tetikleyerek apoptozu inhibe ederler (137).

FGFR3'te meydana gelen germline mutasyonları, reseptörün ligand olmadan sürekli aktif olmasına neden olmaktadır. Bu aktivasyon çeşitli iskelet displazilerinin oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca aynı mutasyonlar mutiple myeloma hücre hatlarında ve t(4;14) translokasyonu taşıyan primer tümörlerde görülmüştür. Bunun yanında aktive edici bu mutasyonlar akut miyeloid lösemi, B hücre – T hücre non-Hodgkin lenfomasında ve bazı solid tümörlerde (kan, prostat, meme) gözlenmiştir (138).

FGFR3 reseptörü en etkin biçimde plazma hücre myelomasında tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. FGFR3'ü hedef alan terapötik ajanlar, myeloma tedavisinde kullanılmaktadır (17, 135). Lenfoma açısından FGFR3'ü hedefleyen çalışmalar kemoterapinin etkinliğini artırmaya yöneliktir. Kotani ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada FGFR3 reseptörünün inhibisyonu Rituximab® ile yapılan kemoterapinin etkisini artırarak, lenfoma hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir (139). Zheng ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada bortezomib® ile kemoterapi uygulanan lenfoma hastalarında, hücrelerin ilaca gösterdikleri direnç FGFR3'teki mutasyonlarla ilişkili olduğu ve FGFR3 ile transfekte edilen hücrelerde ilaca olan direncin arttığı saptanmıştır (137). Fakat hücre hatları kullanılarak yapılan bu çalışmalarda FGFR3 bağımlı ilaç direncinin hangi mekanizma ile olduğu bilinmemektedir (137, 139).

Literatürde FGFR3'nin DLBCL ile ilişkilendirildiği, kesin bilgi bulunmamaktadır. Larson ve arkadaşları, malignant lenfoma hastalarına ait doku örnekleriyle yaptıkları immunohistokimyasal çalışma sonucunda, bazı alt türlerde FGFR3'ün eksprese olduğu gösterilmiştir. Fakat DLBCL'de herhangi bir sonuca rastlanmamıştır. Bu sonucun kullanılan monoklonal antikora bağlı olabileceği düşünülmektedir (135).

Çalışmamızda DLBCL hastalarına ait serum örneklerinde FGFR3 ekspresyonunun artmış olduğu ilk kez gösterilmiştir. Ekspresyondaki bu artış hücre proliferasyonu gibi lenfomagenesisle ilgili olayları tetiklemiş olduğu düşünülebilir. Ayrıca bu reseptörün hangi alt türlerde eksprese olduğunun bulunması halinde, kemoterapiyle kombine biçimde kullanılan terapötik ajanlar sadece bu alt türlerde kullanılabilir. Bu şekilde hem kemoterapinin yan etkilerinden kaçınılır hem de tedavinin etkili bir sonuç vermesi sağlanabilir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Pankreas kanserlerinin erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabilecek protein ve protein splise varyantları antikor mikroarray yöntemi ile 5'i pankreas kanseri, 5'i kronik pankreatitis, 5'i sağlıklı birey olmak üzere 15 bireyin serum örneklerinde tarandı.
2. Lenf kanserlerinin bir alt grubu olan Lenfomanın erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabilecek protein ve protein splise varyantları antikor mikroarray yöntemi ile 17'si difüz büyük B-hücre lenfoması, 17'si kronik lenfositik lösemi, 17'si foliküler lenfoma ve 17'si de sağlıklı bireylere ait olan toplam 68 farklı serum örneğinde tarandı.
3. Çalışmada kullanılmak üzere özel olarak ürettirilen splise varyant antikorlarının özgünlüğü western blot yöntemi ile karaciğer kanser dokusunda ve pankreas kanseri hücre hattında test edildi. "Farklı patern" gösteren proteinler yeni splise varyantı araştırmaları açısından potansiyel kaynak olarak belirlendi.
4. Pankreas kanseri hasta serumlarında gerçekleştirilen biyomarkır taraması sonucunda;
 - Mitojenik aktiviteye sahip olan MAPK8'in ekspresyonunda anlamlı bir artış görülürken, mitoz üzerinde negatif bir etkisi olan MAPK9'un ekspresyonunda anlamlı seviyede azalma görüldü.
5. Kronik pankreatitis hasta serumlarında gerçekleştirilen biyomarkır taraması sonucunda;
 - Karsinogenezisde neoplastik transformasyonu tetikleyen CYP1A1v'nin ekspresyonunda artış gözlemlendi.
 - Endoplazmik Retikulum içinde proteinlerin düzenli katlanamaması sonucu oluşan ER stresi ve aşılamayan ER stresine bağlı olarak gelişen diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve pankreatik kanserde ekspresyonu aratan XBP-1S'in ekspresyonunda anlamlı düzeyde artış gözlemlendi.

- Eksikliğinde pankreatik β -hücrelerinin görev yapamaz hale geldiği bilinen PLD1b (PLD1-114)'nin ekspresyonunda anlamlı azalma görüldü.
6. Lenfoma hasta serumlarında gerçekleştirilen biyomarkır taraması sonucunda;
- DLBCL hastalarına ait serum örneklerinde FGF büyüme faktörleri ile tetiklenen ve hücre büyümesine aracılık eden FGFR3'ün ekspresyonunda anlamlı artış görüldü.
7. Lenfomanın diğer alt gruplarında değerlendirilen proteinler arasında anlamlı seviyede ekspresyon değişimi gösteren bir proteine rastlanmadı. Bu durum hastalığın yüksek derecede heterojen olmasına bağlı olabileceği ve alt türlerin daha iyi sınıflandırılarak çalışılmasının sürece katkı sağlayabileceği düşünüldü.
8. Sonuç olarak; ekspresyon seviyelerinde anlamlı olarak değişim görülen proteinler ilgili hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere ileri çalışmalarla araştırılması gereken birer potansiyel biyomarkır adayı olarak belirlendi.
9. Çalışmamız; splise varyantlarının kanserlerin erken tanısında kullanılabilecek biyomarkırların belirlenmesinden potansiyel aday olduğunu ve bu süreçte antikör mikroyarray çiplerinin etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak bu çalışmanın, mikroyarrayin amacına uygun olarak binlerce farklı splise varyant antikoru kullanılarak yeni çiplerin oluşturulmasına öncülük edeceği düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Weinberg RA (2007). The biology of cancer. New York, Garland Science.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Hamosh A and Thompson MW (2007). Thompson & Thompson genetics in medicine. Philadelphia, Saunders/Elsevier.
3. Kim CB, Ahmed S and Hsueh EC (2011). Current surgical management of pancreatic cancer. J Gastrointest Oncol 2(3): 126-135.
4. The Sol Goldman Pancreatic Cancer Research Center. (2012). Types of Pancreas Tumors. Available from <http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes2.php>. (Accessed 29 March 2013).
5. Zakharova OP, Karmazanovsky GG and Egorov VI (2012). Pancreatic adenocarcinoma: Outstanding problems. World J Gastrointest Surg 4(5): 104-113.
6. Krechler T, Horejs J, Ulrych J, Zeman M, Macasek J, Duskova J and Zak A (2011). [Current status of pancreatic cancer diagnosis]. Cas Lek Cesk 150(11): 587-593.
7. Wang F and Kumar P (2011). The role of radiotherapy in management of pancreatic cancer. J Gastrointest Oncol 2(3): 157-167.
8. Warsame R and Grothey A (2012). Treatment options for advanced pancreatic cancer: a review. Expert Rev Anticancer Ther 12(10): 1327-1336.
9. Alhamdani MS, Youns M, Buchholz M, Gress TM, Beckers MC, Marechal D, Bauer A, Schroder C and Hoheisel JD (2012). Immunoassay-based proteome profiling of 24 pancreatic cancer cell lines. J Proteomics 75(12): 3747-3759.
10. Sun C, Rosendahl AH, Ansari D and Andersson R (2011). Proteome-based biomarkers in pancreatic cancer. World J Gastroenterol 17(44): 4845-4852.
11. Mann KM, Ward JM, Yew CC, Kovochich A, Dawson DW, Black MA, Brett BT, Sheetz TE, Dupuy AJ, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Chang DK, Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Grimmond SM, Rust AG, Adams DJ, Jenkins NA and Copeland NG (2012). Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 109(16): 5934-5941. National Cancer Institute
12. Howlader N NA, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (1975-2009 (Vintage 2009 Populations)). SEER Cancer Statistics

- Review. Available from http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/. (Accessed 06 Kasım, 2012).
13. Ansell SM and Armitage J (2005). Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* **80**(8): 1087-1097.
 14. Younes A and Berry DA (2012). From drug discovery to biomarker-driven clinical trials in lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* **9**(11): 643-653.
 15. Bonnet C, De Prijck B, Lejeune M, Fassotte MF, Van Den Neste E and Beguin Y (2012). [Diffuse large B cell lymphoma: management in 2012]. *Rev Med Suisse* **8**(351): 1582-1584, 1586-1590.
 16. Michallet AS, Lebras L and Coiffier B (2012). Maintenance therapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* **24**(5): 461-465.
 17. Khnykin D, Troen G, Berner JM and Delabie J (2006). The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* **208**(3): 431-438.
 18. Stathis A and Ghilmini M (2012). New agents for the treatment of lymphoma. *Ann Oncol* **23 Suppl 10**: x92-98.
 19. Polanski M and Anderson NL (2007). A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark Insights* **1**: 1-48.
 20. Matsubara J, Honda K, Ono M, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Yanagisawa K, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Hirohashi S and Yamada T (2011). Reduced plasma level of CXC chemokine ligand 7 in patients with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**(1): 160-171.
 21. Perez Diez A MA, Shulzhenko N (2000). *Microarrays for Cancer Diagnosis and Classification*. Austin (TX), Landes Bioscience from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6624/>.
 22. Schroder C JA, Rüffer S, Fellenberg K, Hoheisel JD, (2010) Antibody Microarrays for Expression Analysis. *Antibody Engineering* **Vol. 2**, DOI: 10.1007/978-3-642-01147-4_33
 23. Miura K, Fujibuchi W and Unno M (2012). Splice variants in apoptotic pathway. *Exp Oncol* **34**(3): 212-217.

24. He C, Zhou F, Zuo Z, Cheng H and Zhou R (2009). A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. *PLoS One* **4**(3): e4732.
25. Tazi J, Bakkour N and Stamm S (2009). Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**(1): 14-26.
26. Ekmekci A (1991). *Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri*. Ankara, TDFO.
27. Alberts B (2008). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
28. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT and Murray CJ (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**(9524): 1747-1757.
29. Lodish HF (2013). *Molecular cell biology*. New York, W.H. Freeman and Co.
30. Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
31. Michor F, Iwasa Y and Nowak MA (2004). Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* **4**(3): 197-205.
32. Kinzler KW and Vogelstein B (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* **280**(5366): 1036-1037.
33. Knowles MA and Selby P (2005). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. New York, Oxford University Press.
34. Cooper GM and Hausman RE (2009). *The cell : a molecular approach*. Washington, D.C. Sunderland, Mass., ASM Press ; Sinauer Associates.
35. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J and Thun MJ (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59**(4): 225-249.
36. Novas P (2013). *The Pancreas and Its Functions*. Available from http://pancreasmd.org/education_home.html. (Accessed 28 March, 2013).
37. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO and Caicedo A (2011). Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab* **14**(1): 45-54.
38. Pandol SJ (2010). *The Exocrine Pancreas*. San Rafael (CA).

39. Klikdokter M (2012). Pankreas & Diabetes. Available from <http://www.klikdokter.com/diabetes/read/2010/07/05/118/pankreas---diabetes>. (Accessed 06 April, 2013).
40. Elayat AA, el-Naggar MM and Tahir M (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* **186 (Pt 3)**: 629-637.
41. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO and Caicedo A (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2334-2339.
42. Banks PA, Conwell DL and Toskes PP (2010). The management of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **6**(2 Suppl 3): 1-16.
43. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS and Girardin SE (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* **147**(2): 227-235.
44. Apte MV, Pirola RC and Wilson JS (2009). Pancreas: alcoholic pancreatitis--it's the alcohol, stupid. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(6): 321-322.
45. David CW (2012). Pancreatitis. Available from <http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/pancreatitis/>. (Accessed 27 March, 2013).
46. DiMagno MJ and DiMagno EP (2012). Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **28**(5): 523-531.
47. Solomon S, Whitcomb DC and LaRusch J (1993). PRSS1-Related Hereditary Pancreatitis. *GeneReviews*. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K and Adam MP. Seattle (WA).
48. Whitcomb DC (2004). Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(2): G315-319.
49. Greenfield LJ and Mulholland MW (2011). *Greenfield's surgery : scientific principles and practice*. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
50. Li D, Xie K, Wolff R and Abbruzzese JL (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* **363**(9414): 1049-1057.

51. Lee KJ, Yi SW, Chung MJ, Park SW, Song SY, Chung JB and Park JY (2013). Serum CA 19-9 and CEA levels as a prognostic factor in pancreatic adenocarcinoma. *Yonsei Med J* **54**(3): 643-649.
52. Vaccaro V, Gelibter A, Bria E, Iapicca P, Cappello P, Di Modugno F, Pino MS, Nuzzo C, Cognetti F, Novelli F, Nistico P and Milella M (2012). Molecular and genetic bases of pancreatic cancer. *Curr Drug Targets* **13**(6): 731-743.
53. Greer JB and Brand RE (2011). New developments in pancreatic cancer. *Curr Gastroenterol Rep* **13**(2): 131-139.
54. Armitage JO (2011). Approach to the patient with lymphadenopathy and splenomegaly. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier.
55. Bupa M (2011). Sentinel lymph node biopsy. Available from <http://www.bupa.co.uk/individuals/health-information/directory/s/slnb>. (Accessed 06 April, 2013).
56. Hodgkin (1832). On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* **17**: 68-114.
57. Flavell KJ and Murray PG (2000). Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol* **53**(5): 262-269.
58. Kuppers R, Engert A and Hansmann ML (2012). Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* **122**(10): 3439-3447.
59. Rummel M (2011). Reassessing the Standard of Care in Indolent Lymphoma: A Clinical Update to Improve Clinical Practice. Available from <http://www.medscape.org/viewarticle/725127>. (Accessed 1 April, 2013).
60. Ong ST and Le Beau MM (1998). Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* **25**(4): 447-460.
61. Shiels MS, Engels EA, Linet MS, Clarke CA, Li J, Hall HI, Hartge P and Morton LM (2013). The Epidemic of Non-Hodgkin Lymphoma in the United States: Disentangling the Effect of HIV, 1992-2009. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
62. Nogai H, Dorken B and Lenz G (2011). Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **29**(14): 1803-1811.
63. Guerard EJ and Bishop MR (2012). Overview of non-Hodgkin's lymphoma. *Dis Mon* **58**(4): 208-218.

64. Latta S, Cygan PH, Fried W and Nabhan C (2013). Diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma in the very elderly: challenges and solutions. *Oncology (Williston Park)* **27**(2): 126-130, 132-126, 138.
65. (2013). Correction to: Molecular Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma: the Role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma* **54**(5): 1121.
66. Westin JR and Neelapu SS (2012). Therapy of newly diagnosed follicular lymphoma. *Front Oncol* **2**: 188.
67. Arslan Ö (2009). Foliküler Lenfoma. 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya. 7-10 Ekim 2009: 23-35.
68. Gaidano G, Foa R and Dalla-Favera R (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* **122**(10): 3432-3438.
69. Lu K and Wang X (2012). Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* **5**: 55.
70. Bauman JA and Kole R (2011). Modulation of RNA splicing as a potential treatment for cancer. *Bioeng Bugs* **2**(3): 125-128.
71. Brinkman BM (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* **37**(7): 584-594.
72. Janeway C (2001). *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*. New York, Garland Pub.
73. Pier GB, Lyczak JB and Wetzler LM (2004). *Immunology, infection, and immunity*. Washington, D.C., ASM Press.
74. Underdown BJ and Schiff JM (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* **4**: 389-417.
75. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengten E, Edholm ES, Santini PA, Rath P, Chiu A, Cattalini M, Litzman J, J BB, Huang B, Meini A, Riesbeck K, Cunningham-Rundles C, Plebani A and Cerutti A (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* **10**(8): 889-898.
76. Geisberger R, Lamers M and Achatz G (2006). The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **118**(4): 429-437.
77. Janeway C (2005). *Immunobiology : the immune system in health and disease*. New York, Garland Science.

78. Signore M and Reeder KA (2012). Antibody validation by Western blotting. *Methods Mol Biol* **823**: 139-155.
79. Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, McCartney J, Warren F, Haber E and Oppermann H (1991). Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* **203**: 46-88.
80. Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, Kirsch MI, Meier D and Dubel S (2007). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* **7**: 14.
81. Xiong CY, Natarajan A, Shi XB, Denardo GL and Denardo SJ (2006). Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding. *Protein Eng Des Sel* **19**(8): 359-367.
82. Dubel S (2007). Recombinant therapeutic antibodies. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**(4): 723-729.
83. Chang TW (1983). Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 217-223.
84. Schroder C, Jacob, A., Rüffer, S., Fellenberg, K., Hoheisel, J.D. (2010) Antibody Microarrays for Expression Analysis. **Vol: 2**, DOI: 10.1007/978-3-642-01147-4_33
85. Schroder C, Alhamdani MS, Fellenberg K, Bauer A, Jacob A and Hoheisel JD (2011). Robust protein profiling with complex antibody microarrays in a dual-colour mode. *Methods Mol Biol* **785**: 203-221.
86. NCI (2011). Cancer Research Funding. Available from <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/NCI/research-funding>. (Accessed 29 April, 2013).
87. Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A and Bujanda L (2013). Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta* **418**: 22-29.
88. Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K and Motoo Y (2004). Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* **28**(3): 263-267.

89. Chen F, Yang G and Xia B (2013). Increased Expression of the Spindle Checkpoint Protein BubR1 is Associated with High Cell Proliferation in Primary Gastrointestinal Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell Biochem Biophys*.
90. Okumura M, Kondo S, Ogata M, Kanemoto S, Murakami T, Yanagida K, Saito A and Imaizumi K (2005). Candidates for tumor-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **334**(1): 23-29.
91. Vaccaro V, Gelibter A, Bria E, Iapicca P, Cappello P, Di Modugno F, Simona Pino M, Nuzzo C, Cognetti F, Novelli F, Nistico P and Milella M (2012). Molecular and genetic bases of pancreatic cancer. *Curr Drug Targets* **13**(6): 731-743.
92. Kassa FA, Shio MT, Bellemare MJ, Faye B, Ndao M and Olivier M (2011). New inflammation-related biomarkers during malaria infection. *PLoS One* **6**(10): e26495.
93. Jayakumar C, Ranganathan P, Devarajan P, Krawczeski CD, Looney S and Ramesh G (2013). Semaphorin 3A Is a New Early Diagnostic Biomarker of Experimental and Pediatric Acute Kidney Injury. *PLoS One* **8**(3): e58446.
94. Diamandis EP (2004). How are we going to discover new cancer biomarkers? A proteomic approach for bladder cancer. *Clin Chem* **50**(5): 793-795.
95. Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC and Petricoin EF, 3rd (2002). Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* **2**(1): 76-84.
96. Venables JP, Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Koh C, Gervais-Bird J, Lapointe E, Froehlich U, Durand M, Gendron D, Brosseau JP, Thibault P, Lucier JF, Tremblay K, Prinos P, Wellinger RJ, Chabot B, Rancourt C and Elela SA (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res* **68**(22): 9525-9531.
97. Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Gervais-Bird J, Madden R, Paquet ER, Koh C, Venables JP, Prinos P, Jilaveanu-Pelms M, Wellinger R, Rancourt C, Chabot B and Abou Elela S (2008). Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res* **68**(3): 657-663.

98. Li C, Kato M, Shiue L, Shively JE, Ares M, Jr. and Lin RJ (2006). Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res* **66**(4): 1990-1999.
99. Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, Brunak S, Krainer AR, Topping N, Dyrskjot L, Andersen CL and Orntoft TF (2008). Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. *Mol Cell Proteomics* **7**(7): 1214-1224.
100. Menon R and Omenn GS (2010). Proteomic characterization of novel alternative splice variant proteins in human epidermal growth factor receptor 2/neu-induced breast cancers. *Cancer Res* **70**(9): 3440-3449.
101. Ryan MC, Zeeberg BR, Caplen NJ, Cleland JA, Kahn AB, Liu H and Weinstein JN (2008). SpliceCenter: a suite of web-based bioinformatic applications for evaluating the impact of alternative splicing on RT-PCR, RNAi, microarray, and peptide-based studies. *BMC Bioinformatics* **9**: 313.
102. Mehan MR, Ostroff R, Wilcox SK, Steele F, Schneider D, Jarvis TC, Baird GS, Gold L and Janjic N (2013). Highly multiplexed proteomic platform for biomarker discovery, diagnostics, and therapeutics. *Adv Exp Med Biol* **735**: 283-300.
103. Kaur H, Mao S, Shah S, Gorski DH, Krawetz SA, Sloane BF and Mattingly RR (2013). Next-generation sequencing: a powerful tool for the discovery of molecular markers in breast ductal carcinoma in situ. *Expert Rev Mol Diagn* **13**(2): 151-165.
104. Erho N, Buerki C, Triche TJ, Davicioni E and Vergara IA (2012). Transcriptome-wide detection of differentially expressed coding and non-coding transcripts and their clinical significance in prostate cancer. *J Oncol* **2012**: 541353.
105. Pio R, Blanco D, Pajares MJ, Aibar E, Durany O, Ezponda T, Agorreta J, Gomez-Roman J, Anton MA, Rubio A, Lozano MD, Lopez-Picazo JM, Subirada F, Maes T and Montuenga LM (2010). Development of a novel splice array platform and its application in the identification of alternative splice variants in lung cancer. *BMC Genomics* **11**: 352.

106. Wellhausen R and Seitz H (2012). Facing current quantification challenges in protein microarrays. *J Biomed Biotechnol* **2012**: 831347.
107. Mann KM, Ward JM, Yew CC, Kovochich A, Dawson DW, Black MA, Brett BT, Sheetz TE, Dupuy AJ, Chang DK, Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Grimmond SM, Rust AG, Adams DJ, Jenkins NA and Copeland NG (2012). Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(16): 5934-5941.
108. Tian X, Winkler A, Paschke S, Chen G, Zhou S, Bachem M, Henne-Bruns D and Kornmann M (2010). Functions of C-Jun terminal kinases 1 and 2 in pancreatic cancer cells. *Z Gastroenterol* **48**(05): P1_5.
109. Bose C and Udupa KB (2008). Erythropoietin enhancement of rat pancreatic tumor cell proliferation requires the activation of ERK and JNK signals. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(2): C394-405.
110. Zhang YH, Wang SQ, Sun CR, Wang M, Wang B and Tang JW (2011). Inhibition of JNK1 expression decreases migration and invasion of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Med Oncol* **28**(4): 966-972.
111. Zhang Y, Feurino LW, Zhai Q, Wang H, Fisher WE, Chen C, Yao Q and Li M (2008). Thymosin Beta 4 is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates proinflammatory cytokine secretion and JNK activation. *Cancer Biol Ther* **7**(3): 419-423.
112. Li M, Feurino LW, Li F, Wang H, Zhai Q, Fisher WE, Chen C and Yao Q (2007). Thymosinalpha1 stimulates cell proliferation by activating ERK1/2, JNK, and increasing cytokine secretion in human pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* **248**(1): 58-67.
113. Anbalagan M and Sabapathy K (2012). JNK1 and JNK2 play redundant functions in Myc-induced B cell lymphoma formation. *Int J Cancer* **130**(8): 1967-1969.
114. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M and Wagner EF (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* **15**(5): 713-725.
115. Das M, Garlick DS, Greiner DL and Davis RJ (2011). The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* **25**(6): 634-645.

116. Sun BK, Kim JH, Nguyen HN, Oh S, Kim SY, Choi S, Choi HJ, Lee YJ and Song JJ (2011). MEKK1/MEKK4 are responsible for TRAIL-induced JNK/p38 phosphorylation. *Oncol Rep* **25**(2): 537-544.
117. Bauer M, Herbarth O, Rudzok S, Schmucking E, Muller A, Aust G and Grabsch C (2007). Diversity of common alternative splicing variants of human cytochrome P450 1A1 and their association to carcinogenesis. *Int J Oncol* **31**(1): 211-218.
118. Leung YK, Lau KM, Mobley J, Jiang Z and Ho SM (2005). Overexpression of cytochrome P450 1A1 and its novel spliced variant in ovarian cancer cells: alternative subcellular enzyme compartmentation may contribute to carcinogenesis. *Cancer Res* **65**(9): 3726-3734.
119. Fujimoto T, Yoshimatsu K, Watanabe K, Yokomizo H, Otani T, Matsumoto A, Osawa G, Onda M and Ogawa K (2007). Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Anticancer Res* **27**(1A): 127-131.
120. Sengupta S, Sharma CG and Jordan VC (2010). Estrogen regulation of X-box binding protein-1 and its role in estrogen induced growth of breast and endometrial cancer cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2**(2): 235-243.
121. Ding LH, Ye QN, Yan JH, Zhu JH, Lu QJ, Wang ZH and Huang CF (2004). [XBP-1 interacts with estrogen receptor alpha (ERalpha)]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **20**(3): 332-336.
122. Davies MP, Barraclough DL, Stewart C, Joyce KA, Eccles RM, Barraclough R, Rudland PS and Sibson DR (2008). Expression and splicing of the unfolded protein response gene XBP-1 are significantly associated with clinical outcome of endocrine-treated breast cancer. *Int J Cancer* **123**(1): 85-88.
123. Hirota M, Kitagaki M, Itagaki H and Aiba S (2006). Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. *J Toxicol Sci* **31**(2): 149-156.
124. Shao D, Liu J, Ni J, Wang Z, Shen Y, Zhou L, Huang Y, Wang J, Xue H, Zhang W and Lu L (2013). Suppression of XBP1S mediates high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix synthesis in renal mesangial cell and kidney of diabetic rats. *PLoS One* **8**(2): e56124.

125. Xu G, Liu K, Anderson J, Patrene K, Lentzsch S, Roodman GD and Ouyang H (2012). Expression of XBP1s in bone marrow stromal cells is critical for myeloma cell growth and osteoclast formation. *Blood* **119**(18): 4205-4214.
126. Evans A and Costello E (2012). The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Front Physiol* **3**: 270.
127. Li X, Ma Q, Xu Q, Duan W, Lei J and Wu E (2012). Targeting the cancer-stroma interaction: a potential approach for pancreatic cancer treatment. *Curr Pharm Des* **18**(17): 2404-2415.
128. Gomez-Cambronero J (2010). New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal* **10**: 1356-1369.
129. Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo JA, van der Velden A, Tian H, Di Paolo G, Nieswandt B, Kanaho Y and Frohman MA (2012). Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* **5**(249): ra79.
130. Kang DW, Choi KY and Min do S (2011). Phospholipase D meets Wnt signaling: a new target for cancer therapy. *Cancer Res* **71**(2): 293-297.
131. Kang DW, Park MH, Lee YJ, Kim HS, Lindsley CW, Alex Brown H and Min do S (2011). Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells. *Int J Cancer* **128**(4): 805-816.
132. Riebeling C, Muller C and Geilen CC (2003). Expression and regulation of phospholipase D isoenzymes in human melanoma cells and primary melanocytes. *Melanoma Res* **13**(6): 555-562.
133. Bosch RR, Harris AB, van Emst-de Vries SE, De Pont JJ and Willems PH (2001). Rat pancreatic acinar cells express a cytosolic phospholipase D1b isoform that is not regulated by cholecystokinin. *Pflugers Arch* **442**(6): 910-919.
134. Chen MC, Paez-Espinosa V, Welsh N and Eizirik DL (2000). Interleukin-1beta regulates phospholipase D-1 expression in rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **141**(8): 2822-2828.
135. Larson A and Cook JR (2008). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) expression in malignant lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **16**(4): 322-325.

136. Gorbenko O, Ovcharenko G, Klymenko T, Zhyvoloup O, Gaman N, Volkova D, Gout I and Filonenko V (2009). Generation of monoclonal antibody targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Hybridoma (Larchmt)* **28**(4): 295-300.
137. Zheng W, Guan M, Zhu L, Cai Z, Chung V, Huang H and Yen Y (2010). Bortezomib therapeutic effect is associated with expression and mutation of FGFR3 in human lymphoma cells. *Anticancer Res* **30**(6): 1921-1930.
138. Zingone A, Cultraro CM, Shin DM, Bean CM, Morse HC, 3rd, Janz S and Kuehl WM (2010). Ectopic expression of wild-type FGFR3 cooperates with MYC to accelerate development of B-cell lineage neoplasms. *Leukemia* **24**(6): 1171-1178.
139. Kotani N, Ishiura Y, Yamashita R, Ohnishi T and Honke K (2012). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) associated with the CD20 antigen regulates the rituximab-induced proliferation inhibition in B-cell lymphoma cells. *J Biol Chem* **287**(44): 37109-37118.

10. ETİK KURUL ONAYI




Medizinische Fakultät Heidelberg

Willkommensan der Med. Fak. (H) (also Gleichgeschlechtlich) v. J. (2004) Heidelberg

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. M. W. Büchler
Herrn Prof. Dr. med. J. Werner
Chirurgische Klinik der Universität
Im Neuenheimer Feld 110
69120 Heidelberg

Datum: 28.12.2007
Mat/Ja:

Votum

Antrags-Nr.: 159/2007 (Bitte stets angeben!)

Titel: Aufbau einer Blutzellen und Serumbank zur Etablierung diagnostischer und prognostischer Marker benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes

Gepforderte Unterlagen: Änderungsantragsformular vom 29.11.2007
Untersuchungsplan vom 28.11.2007, Version 5
CD-ROM
Schreiben vom 13.12.2007 (eingegangen am 14.12.2007)

Sehr geehrter Herr Professor Büchler,
sehr geehrter Herr Professor Werner,

die Ethikkommission hat sich im vereinfachten Verfahren durch ein Mitglied mit den oben näher bezeichneten Unterlagen befasst und hat keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken gegen den Änderungsantrag und die Weiterführung der Studie.

Änderungen in Organisation und Ablauf der Studie sind der Kommission, zusammen mit einer Bewertung der Nutzen-Risiko-Relation, umgehend mitzuteilen. Sowohl die Antragsnummer als auch die geänderten Passagen sollten in den betreffenden Unterlagen deutlich gekennzeichnet sein, da anderenfalls keine zügige Bearbeitung möglich ist.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien. Ihren Beratungen liegt gemäß der gültigen Berufsordnung die maßgebende Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki in der jeweils gültigen Fassung zugrunde.

Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Ethikkommission Sie darauf aufmerksam, dass die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung der Studie bei allen teilnehmenden Ärzten liegt.

Mit freundlichen Grüßen


 Prof. Dr. med. Rainer Mattem
 Stabv. Vorsitzender der Ethikkommission

EINGEGANGEN
 09. JAN. 2008
 Erled. 


Ethikkommission
Medizinische Fakultät Heidelberg

Alte Gleichgeschlechtlich 11/1
D-69120 Heidelberg
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-0 (Empfang)
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-22
E: ethikkommission@medizinische-fakultaet-heidelberg.de
www.ethikkommission-med.uni-heidelberg.de

Vorsitz:
Prof. Dr. med. Thomas Strowitzki

Stabv. Vorsitz:
Prof. Dr. med. Johannes Schröder
Prof. Dr. med. Rainer Mattem

Geschäftsleitung:
Dr. med. Verena Pfeilbühler
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-10
E: verena.pfeilbuehler@med.uni-heidelberg.de

ANSPRECHPARTNER:
AMG-/MPG-Studien federführend:
Anne-Sophie Schürmann
Dipl.-Inform. Med.
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-13
E: anne.schoermann@med.uni-heidelberg.de

AMG-Studien beteiligt:
Stefanie Schneider, Dipl.-Inf. (FH)
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-14
E: stefanie.schneider@med.uni-heidelberg.de

Sonstige Studien:
Martina Jenner, DV-Kaufrau
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-11
E: martina.jenner@med.uni-heidelberg.de

Rechnungswesen:
Katharina Schäfer, Industriekaufrau
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-12
E: katharina.schaefer@med.uni-heidelberg.de

Empfang:
Elisabeth Wirth
Berufshelferin (DMS), Dipl.-Inf. (FH)
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-15
E: elisabeth.wirth@med.uni-heidelberg.de

Qualitätsmanagement:
Dr. med. Verena Pfeilbühler
Qualitätsmanagement (DMS)
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-10
E: verena.pfeilbuehler@med.uni-heidelberg.de

Martina Jenner, DV-Kaufrau
Qualitätsmanagement (DMS)
Tel: +49 (0) 6221 / 33 8 22-11
E: martina.jenner@med.uni-heidelberg.de

Bankverbindung:
Baden-Württembergische Bank Stuttgart
Konto-Nr.: 7421 500 429
BLZ: 600 501 01
SWIFT/BIC Code: SOLADE33
IBAN-Nr.: DE 64 600501007421500429

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport : 42073996910
Soyadı, Adı : YILDIRIM, Adem
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 10/01/1989, TRABZON
Medeni hali : Bekar
Telefon : 537 718 65 07
Faks :
E-Posta : a.yildirim61@hotmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	:	
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2012
Lisans	: İstanbul Üniversitesi	
2010		
Lise	: Sürmene Anadolu Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2012-halen

YABANCI DİL

İngilizce

